

· 实验研究 ·

13 个 VNTR 位点用于 113 株结核分支杆菌的基因分型研究

曹晓慧 蒋毅 张媛媛 刘志广 赵秀芹 金秀琴 韩宝龙 徐瑞兴
刘敬华 吕晶 薛小洛 万康林

【摘要】 目的 应用数目可变串联重复序列(VNTR)分子分型技术,对北京地区 113 株肺结核临床分离菌株进行分型研究,探讨北京地区菌株 DNA 多态性和基因型特征。方法 采用 PCR 和琼脂糖凝胶电泳技术对结核分支杆菌 13 个 VNTR 位点进行检测,并应用 Gel-Pro analyzer 3.1 软件和 BioNumerics 3.0 软件进行结果分析。结果 113 株结核分支杆菌可分为 4 个基因型(分别为 I、II、IV 和 V 型),其中 I 型占 92.0%(104/113),其他 3 型所占比例很小,分别为 II 型占 4.4%(5/113),IV 和 V 型均为 1.8%(2/113),而标准菌株 H37Rv 在分型中为独立的一个基因型,即 III 型。结论 北京地区的结核分支杆菌存在基因多态性,其主要流行型为 I 型。

【关键词】 结核分支杆菌;基因分型;聚类分析;数目可变串联重复序列技术

Study on the genotyping of 113 *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Beijing based on 13 variable number of tandem DNA repeats CAO Xiao-hui*, JIANG Yi, ZHANG Yuan-yuan, LIU Zhi-guang, ZHAO Xiu-qin, JIN Xiu-qin, HAN Bao-long, XU Rui-xing, LIU Jing-hua, LV Jing, XUE Xiao-luo, WAN Kang-lin. Institute for Infectious 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 Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs) analysis was a recently developed method which could serve as a 'real-time' genotyping tool for *Mycobacterium tuberculosis*. One hundred and thirteen *M. tuberculosis* isolates from the patients with tuberculosis in Beijing were analysed using the reference method to study the characters of genetic diversity and genotype. Methods Thirteen tandem repeat loci(ETR-A, ETR-C, ETR-D, MIRU10, MIRU16, MIRU27, MIRU31, MIRU40, Mtub21, Mtub30, Mtub38, Qub11a, Qub11b) in the total genome of MTB were analyzed by PCR and agarose gel electrophoresis method. The characters of the polymorphism of DNA fingerprinting of one hundred and thirteen MTB strains were analyzed with Gel-Pro analyzer 3.1 software and BioNumerics 3.0 software. Results One hundred and thirteen MTB strains were characterized and classified in to four genotype families(type I, type II, type IV, type V) based on thirteen tandem repeat loci. One hundred and four isolates(92.0%) belonged to type I, the other three genotypes scattered, five strains(4.4%) remaining with type II, while type IV and type V having the same quantity 1.8%(2/113). *M. tuberculosis* H37Rv belonged to a unattached genotype(type III). Conclusion There was obvious length polymorphism in the *M. tuberculosis* isolates which implied that type I was the epidemic strain clusters in *M. tuberculosis* in Beijing. VNTRs analysis seemed to be a simple, rapid, sensitive and valuable tool for epidemiological studies of *M. tuberculosis* complex organisms.

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

结核病再度肆虐,究其原因有多种,其中主要的原因之一是结核分支杆菌的变异。因此,对该菌进

行基因水平的研究和分型鉴定,以明了其基因特征及主要流行菌型,对结核病有效的防治具有重要意义。我们选取结核分支杆菌基因组中 13 个数目可变串联重复序列(variable number of tandem repeats, VNTR)位点,采用 PCR、琼脂糖凝胶电泳技术和 BioNumerics (Version 3.0)软件,对来自北京市西城区的 113 例结核患者临床分离株进行了分子分型分析。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471526)

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(曹晓慧、蒋毅、张媛媛、刘志广、赵秀芹、刘敬华、万康林);北京市第二医院(金秀琴、韩宝龙、徐瑞兴、吕晶、薛小洛)

第一作者现工作单位:100049 北京,中国科学院研究生院;100031 北京市第二医院

通讯作者:万康林,Email: wankanglin@icdc.cn

材料与方 法

1. VNTR 位点选择:参照文献[1-10]和细菌基因数据库^[11],初步筛选 13 个串联重复基因位点。13 个 VNTR 位点及其引物序列见表 1。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

表1 各 VNTR 位点引物序列及重复单元片段大小

位点名称	引物序列 (5'~3')	片段(bp)
ETR-A	L)ATTTTCGATCGGGATGTTGAT	75
	R)TCGGTCCCACACCTCTTA	
ETR-C	L)GACTTCAATGCGTTGTTGGA	58
	R)GTCTTGACCTCCACGAGTGC	
ETR-D	L)GCGCGAGAGCCCGAACTGC	77
	R)GCGCAGCAGAAACGTCAGC	
MIRU10	L)GTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	53
	R)GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	
MIRU16	L)TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA	53
	R)CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC	
MIRU27	L)TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA	53
	R)GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA	
MIRU31	L)ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	53
	R)GTGCCGACGTGGTCTTGAT	
MIRU40	L)GGGTTGCTGGATGACAACGTGT	54
	R)GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	
Mtub21	L)AGATCCAGTTGTCTGTCGTC	57
	R)CAACATCGCCTGGTTCTGTA	
Mtub30	L)AGTCACCTTTCTACCACTCGTAAC	58
	R)ATTAGTAGGGCACTAGCACCTCAAG	
Mtub38	L)GCCAAAAAGCATGGGAACGTGCCCT	63
	R)GGTTGTCCCCGAGTATCTC	
Qub11a	L)CCCATCCCGCTTAGCACATTCGTA	69
	R)TTCAGGGGGGATCCGGGA	
Qub11b	L)CGTAAGGGGTGCGGGAATAGG	69
	R)CGAAGTGAATGGTGGTGGCAT	

2. 结核分支杆菌标准株:结核分支杆菌标准菌株 H37R_v 购自中国药品生物制品检定所。

3. 主要试剂:100 bp DNA Ladder、Taq DNA 聚合酶、dNTP、EB 染料购自华美生物工程公司。

4. 菌株来源:113 株肺结核临床分离菌株均由北京市西城区结核病防治所门诊患者痰标本分离获得。由北京市结核病控制研究所负责传代培养。按户口所在地属本市患者 63 例、外地患者 50 例,其中男性 70 例,女性 43 例。患者平均年龄 38.7 岁。

5. 结核分支杆菌 DNA 模板的制备:取常规 L-J 培养基培养、生长良好的结核菌 1~2 菌环菌落溶于 400 μl TE(pH 值 8.3)中,在漩涡振荡器上振荡至块状固体菌落均匀溶于 TE 中。沸水浴 30 min, 12 000 r/min 离心 3 min,取上清备用(-20℃ 保存)。

6. VNTR-PCR:采用 25 μl PCR 反应体系,其中包括 2 ng 模板 DNA、1.5 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTP、上下游引物共 30 pmol/L、1.5 U Taq DNA 酶。反应条件:预变性 94℃ 10 min;循环

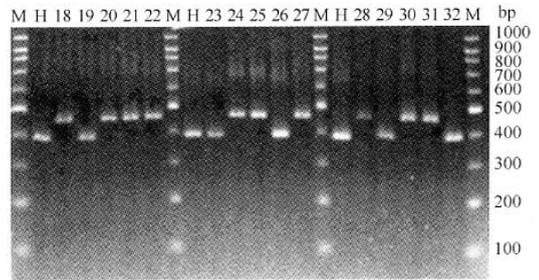
94℃ 1 min, 62℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 共 30 个循环。最后延伸 72℃ 10 min。

7. 琼脂糖凝胶电泳:PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶恒电压(10 V)电泳,1.5 μl/ml EB 染色 15 min。

8. 结果分析:应用 100 bp DNA Ladder 确定 PCR 产物的分子量大小,BioNumerics 3.0 软件对菌株进行聚类分析。

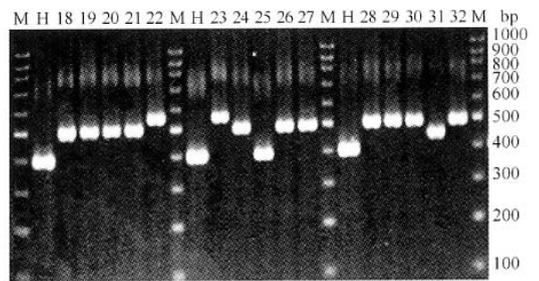
结 果

1. VNTR 多态性检测^[12]:本研究共选用了 13 个特异性较好的 VNTR 位点进行分型分析,结果显示北京市 113 例患者肺结核临床分离菌株的 VNTR 呈现明显的多态性(图 1~4)。



M:100 bp DNA Ladder; H:H37R_v; 18~32:BJXC018~BJXC032

图1 菌株 BJXC018~BJXC032 ETR-A 位点多态性检测结果

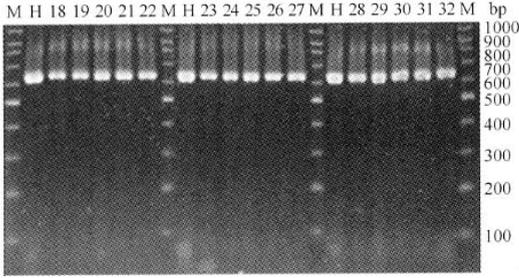


M:100 bp DNA Ladder; H:H37R_v; 18~32:BJXC018~BJXC032

图2 菌株 BJXC018~BJXC032 MIRU40 位点多态性检测结果

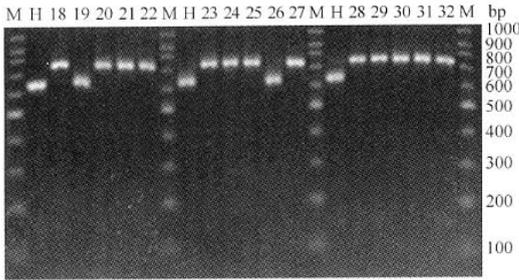
2. 聚类分析:在每一个菌株的特异性数码编码基础上,利用 BioNumerics 3.0 软件进行聚类分析,结果见图 5。113 株结核分支杆菌可分为 4 个基因型(分别为 I、II、IV 和 V 型),其中 I 型占 92.0% (104/113),其他 3 型所占比例很小,分别为 II 型占 4.4% (5/113),IV 和 V 型均为 1.8% (2/113),而标准菌株 H37R_v 在本次分型中为独立的一个基因型,即 III 型(图 5)。

与检测的菌株样本量少、收集的临床菌株还不能完全代表真实整体有关。



M:100 bp DNA Ladder; H:H37R_v; 18~32:BJXC018~BJXC032

图3 菌株 BJXC018~BJXC032 MIRU27 位点多态性检测结果



M:100 bp DNA Ladder; H:H37R_v; 18~32:BJXC018~BJXC032

图4 菌株 BJXC018~BJXC032 MIRU31 位点多态性检测结果

讨论

结核分支杆菌的分型鉴定技术包括 IS6110-RFLP、PCR-RFLP、Spoligotyping、PFGE 以及序列分析等多种。近年来,随着细菌基因组全序列的成功测定,产生了以 VNTR 为检测目标的分型方法^[1],根据被检测菌株基因组中不同独立位点的 VNTR 重复单元拷贝数的多少进行数字编码,然后根据每个菌株的数字编码的不同,利用相关软件通过计算机对这些菌株进行自动分型。该方法操作简单,重复性好,可比性强,并能提供数字式的分型信息,具有对大量样本的分析能力,适合在基层推广应用,且可进行网络系统分型鉴定,从世界范围来研究结核病的流行规律和结核分支杆菌的进化。

本次对 113 例肺结核患者临床分离菌株基因分型研究显示,所检测的结核分支杆菌中大部分(92.0%)可以归属于一个基因型,可能为本地区的主要流行株,应作为防治研究工作的重点,加强对此型菌株的监测力度,并进行病原特征、致病性、药物敏感性等深入地研究。此外,在聚类分析中其他 3 个型所包含菌株数量很少,可能为散发病例,也可能

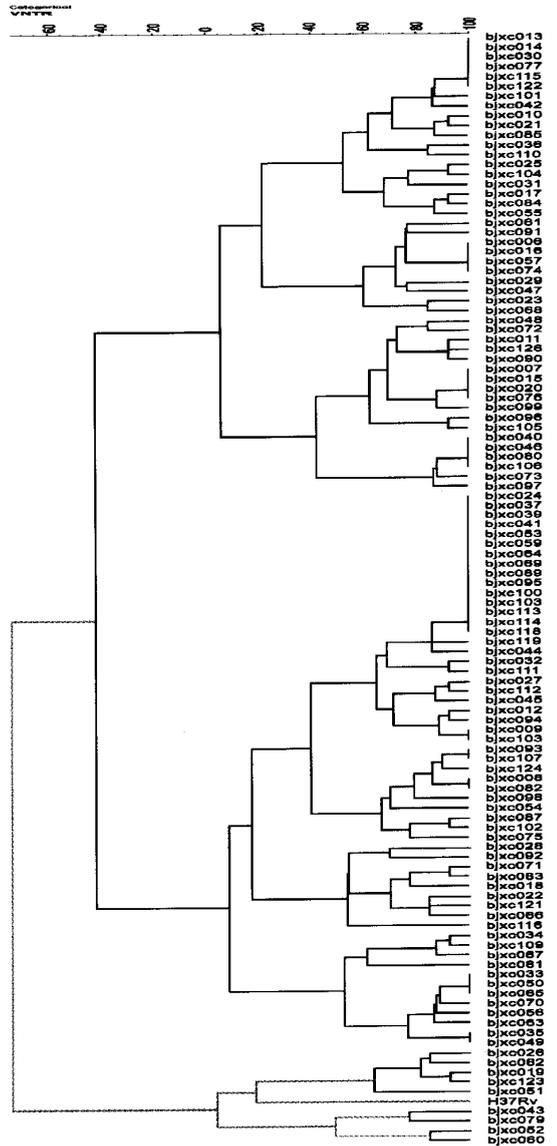


图5 北京地区分离 113 株结核分支杆菌聚类分析树状图谱

在本次研究中有 15 株菌株显示出完全相同的 VNTR 基因分型,且在聚类分析的树状图上处于遗传位点的起始处。我们按性别、年龄、新发、复发、本市、外地、现住址、工作地点、耐药情况等方面进行分析,并未找到流行病学关联点。这有可能是由于本次研究选用 VNTR 位点较少有关。增加 VNTR 位点,进一步完善分型规范,可得出更加精细的达到株水平的基因分型结果。

(本研究得到北京市结核病控制研究所屠德华主任和丁北川主任的大力支持,谨此感谢)

参 考 文 献

- 1 Gascoyne-Binzi DM, Barlow RE, Frothingham R, et al. Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. J Clin Microbiol, 2001, 39: 69-74.
- 2 Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol, 1999, 37: 2607-2618.
- 3 Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, et al. Stability of variable-number tandem isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2002, 40: 4561-4566.
- 4 Sola C, Ferdinand S, Mammina C, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a spoligotyping database for population-based analysis. J Clin Microbiol, 2001, 39: 1559-1565.
- 5 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.
- 6 Viana-Niero C, Gutierrez C, Sola C, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. J Clin Microbiol, 2001, 39: 57-65.
- 7 Frothingham R, Meeker O' Commell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DAN repeats. Microbiology, 1998, 144: 1189-1196.
- 8 Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol Microbiol, 2000, 36: 762-771.
- 9 Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, et al. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiology, 2002, 148 Pt 2: 519-528.
- 10 刘敬华, Christine Pourcel, 万康林, 等. 7 个 VNTR 位点用于 65 株结核分支杆菌基因多态性的研究. 中华微生物学与免疫学杂志, 2004, 24: 733-737.
- 11 <http://minisatellites.u-psud.fr>
- 12 Kwarra A, Schiro R, Cowan LS, et al. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol, 2003, 41: 2683-2685.

(收稿日期: 2006-01-26)

(本文编辑: 张林东)

· 疾病控制 ·

云南省昭通市 1953-2003 年炭疽流行病学分析

金碧荣 熊绍云 谢玲 曹继东 代友枢

云南省昭通市 1953 年开始有人、畜炭疽病系统疫情报告; 1957 年 5 月昭阳区首次报告炭疽发病 14 例, 之后陆续在鲁甸、巧家、盐津、永善、镇雄、彝良、威信等县有发病, 大关、绥江、水富县无病例, 但大关、水富县曾有牲畜炭疽疫情报告。1957-2003 年全市 8 个县(区) 累计报告皮肤炭疽 450 例, 死亡 16 例, 年均发病率 0.27/10 万, 病死率 35.56%。曾出现 1966 年(28 例)、1981 年(20 例)、1990 年(34 例) 及 1995 年(32 例) 4 个发病高峰年。在 51 年中有 11 个年度无疫情报告(1953-1956、1968-1972、1976、1983 年)。病例主要集中在鲁甸、昭阳区、镇雄和盐津 4 县(占 95.3%)。进入 90 年代后, 鲁甸县每年继续有散发病例, 昭阳、镇雄偶有局部流行。1992 年市疾病预防控制中心急传科在鲁甸疫区的 55 份土壤(污染土壤 35 份、牧场土壤 20 份) 和 4 份病死畜皮毛样本中各检出 1 株炭疽杆菌。从时间分布看, 全年均有散发, 7-9 月为发病高峰(占 59%)。发病以青壮年农民为主, 40 岁以下病例占 72%; 病例大多为皮肤型炭疽, 病损部位以上肢及头面为多(86%)。最短潜伏期 1 天, 最长 11 天, 平均 4 天左右。感染方式, 以屠宰病死牲畜感染占 65.0%, 加工烹

调占 22.5%, 接触病畜占 7.5%, 不明原因感染占 5.0%。

分析: 由于昭通市部分地区(桃源、茨院、守望、小龙洞等乡镇) 已形成炭疽病的历史疫源地, 造成炭疽区域性流行。畜间炭疽流行引发人炭疽感染发病, 而畜主缺乏防病意识, 病死牲畜尸体多继续屠宰食用或贩卖, 只有个别深埋; 无利用价值的随意丢弃, 造成畜间疫情扩散; 在屠宰、加工或烹调过程中感染皮肤炭疽。该地区畜用炭疽疫苗接种率低。在疫区接种炭疽疫苗属有偿服务, 部分群众因经济困难或认识不足, 牲畜接种率只有 60% 左右。为有效控制疫情需做好以下工作: ①重点强调屠宰、加工、食用病死畜肉的危害; 避免接触病死畜和动物类产品。②加强疫情监测, 防止局部流行或暴发。卫生和畜牧部门要密切配合, 做好疫区人畜发病情况、范围、污染程度的流行病学调查和消毒处理; ③加强疫区牲畜的疫苗预防注射, 接种率要保持在 85% 以上。④严格把握牲畜收购、饲养、放牧、调运、屠宰、加工等环节的兽医卫生监督 and 检疫措施; 对病死畜要坚决焚烧或消毒后深埋, 污染环境要彻底消毒; 防止疫情扩散或蔓延。

(收稿日期: 2005-09-22)

(本文编辑: 尹廉)