

## 四川地区北京型结核分枝杆菌的 MIRU-VNTR 基因分型

冯 钦<sup>1</sup>, 景誉庆<sup>1</sup>, 黄正辉<sup>1</sup>, 段菁岳<sup>1</sup>, 郑 超<sup>1</sup>,  
孙宏虎<sup>1</sup>, 钟 晶<sup>2</sup>, 孙 群<sup>1</sup>

(1. 四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;

2. 成都市结核病防治院, 成都 610016)

**摘 要:** 用寡核苷酸多态性基因分型(Spoligotyping)对 2008 年 1 月至 2010 年 10 月间采集的 211 株结核分枝杆菌临床分离株进行基因分型, 然后对北京型结核分枝杆菌 VNTR 位点的多态性进行检测。选用的 12 个 VNTR 位点存在较高的基因多态性, 该 12 位点组合分辨能力(HGI=0.99985)高于标准的 VNTR-12 位点组合(HGI=0.99546), 其中多态性较高的 7 位点组合 HGI 指数为 0.99977。因此, 7 位点组合可以作为四川地区北京家族分枝杆菌的一线分型方法。

**关键词:** 结核分枝杆菌; 北京家族; 寡核苷酸; 数目可变串联重复序列; 四川地区

**中图分类号:** R378.911

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0490-6756(2014)04-0851-06

## Genotyping of Beijing family of *mycobacterium tuberculosis* isolates from sichuan with MIRU-VNTR

FENG Qin<sup>1</sup>, JING Yu-Qing<sup>1</sup>, HUANG Zheng-Hui, DUAN Jing-Yue<sup>1</sup>, ZHENG Chao<sup>1</sup>,  
SUN Hong-Hu<sup>1</sup>, ZHONG Jing<sup>2</sup>, SUN Qun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. Chengdu Anti-Tuberculosis Hospital, Chengdu 610016, China)

**Abstract:** Clinical *M. tuberculosis* isolates from Jan 2008 to Oct 2010 were genotyped by Spoligotyping, and Beijing family was further analyzed for the polymorphism of the twelve tandem repeat loci. Analysis based on MIRU-VNTR for 162 Beijing isolates suggested that the selected 12 loci show a higher HGI value compared with the original 12 loci method. Using 7-locus VNTR of high polymorphism, the HGI value (0.9998) was obtained. It is suggested that the method of 7-locus can be used as the first-line molecular typing tool for Beijing family isolates of *M. tuberculosis*.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; Beijing family; Oligonucleotides; VNTR; Sichuan area

## 1 引言

结核病目前仍然严重危害着人类的健康,中国是 22 个结核病高负担国家之一,而北京型结核分枝杆菌是导致中国人群中结核病流行的主要原因<sup>[1]</sup>. 1995 年, Van Soolingen 等研究报道称在中国北京地区发现了一种结核分枝杆菌流行菌株,并将此类菌株命名为北京家族结核分枝杆菌,其典型基因特征为间隔区第 1~34 寡核苷酸片段缺失<sup>[2]</sup>,研究表明北京家族与耐药相关,尤其是对利福平、异烟肼和氧氟沙星的耐药,并伴随有较高的多重耐药率<sup>[3]</sup>. 四川地区近年已成为第二大结核病省,北京型为主要流行菌株,该地区独特的地理、气候和生活特点也有可能对北京家族结核分枝杆菌的传播和爆发产生影响,而此前针对四川地区北京型结核分枝杆菌的研究较少<sup>[4]</sup>. 大量相关研究正在寻找北京型结核分枝杆菌未知的传播方式及途径.

在全球各地区,结核分枝杆菌优势群体通常归属于单一或者某几种基因家族,它们的共同特征是所含菌株有紧密的基因相关性,其中北京家族尤为明显,同时此类菌株具有高度的同源性并且不同北京家族亚型有可能表现出差异性的特征,如耐药性和扩散能力,因此有效的基因分型方法对于北京家族亚型的鉴定较为重要<sup>[5]</sup>. 北京型家族鉴定的标准黄金方法是间隔区寡核苷酸多态性分型法, IS6110 限制性片段长度多态性( IS6110-RFLP)是结核分枝杆菌分型的标准方法,后者操作复杂,耗时多,并且对 DNA 要求很高,数目可变串联重复序列分型方法(VNTR)如今已经广泛应用于结核流行病学研究中,数目可变串联重复序列是以 PCR 为基础的基因分型技术,该法操作简单、能提供数字式的分型信息、重复性好、可比性强、能对大量样本进行分析,同时可以进行实验室间的数据共享,目前已经成为一种高效的细菌分型鉴定方法. 美国疾控中心推荐使用 12 位点的 MIRU-VNTR 分型方法,不过 12 位点的 MIRU-VNTR 分型对北京家族菌株的分辨能力有限<sup>[6]</sup>;而分辨能力较高的 24 位点分型方法是针对所有来源的菌株,并不完全适用于北京基因型菌株的分型研究. 2011 年,赵于丁等<sup>[7]</sup>提出了适用于四川地区菌株基因分型的 12 位点组合方案,目前尚不清楚这些位点对于四川地区北京家族菌株的分辨能力如何. 本研究的目的是评估基于结核分枝杆

菌的散在分布数目可变串联重复序列的 12 个 VNTR 位点(VNTRs 0424、0802、0960、1644、1955、2163b、2996、3007、3192、3690、4052 和 4348)在四川地区北京家族结核分枝杆菌分子流行病学中的应用,调查不同的 VNTR 组合在四川地区北京型结核分枝杆菌中的分辨能力,建立四川地区北京型菌株的一线分型方法,同时为四川地区结核分枝杆菌流行病学研究提供有价值的信息.

## 2 材料和方法

### 2.1 材料

211 株结核分枝杆菌采自于成都市结核病防治院 2008 年 1 月~2010 年 10 月间分离的临床株,按全国结核病细菌学检验标准化规程培养,于-80℃ 的菌株库中保存,标准菌株 H37Rv 作为本次试验的对照菌株.

### 2.2 方法

2.2.1 DNA 提取 所有临床分离菌株的基因组 DNA 提取采用氯仿-异戊醇方法,于-20℃ 保存.

2.2.2 Spoligotyping 此操作方法根据参考文献[8],由含生物素标记的引物扩增得到整个 DR 区,将 43 个 Van Embden 等推荐的寡核苷酸共价结合到尼龙膜上,DR 区扩增产物与尼龙膜上寡核苷酸杂交,通过处理后化学发光显示出特异性的指纹图谱,结果在 SITVIT2 数据库中进行比对.

2.2.3 MIRU-VNTR VNTR 各位点引物及扩增条件参照文献[6],引物由上海 Invitrogen 公司合成扩增反应在 25 μL 反应体系中进行,其中含上下游引物各 10pmol、2×Taq PCR Master-mix 12.5 μL、模板 DNA 1 μL,标准菌株 H37Rv 作为阳性对照,PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,以 100bp DNA Ladder marker 作为标准分子量,使用 Quantity one(version 4.62)进行分子定量,并计算出各位点的重复数.

2.2.4 统计分析 各位点串联重复数和 Spoligotyping 结果在 <http://www.miru-vntrplus.org> 网站上进行聚类分析,VNTR 位点分辨力通过公式  $h=1-\sum x_i^2/[n/(n-1)]$  得到,  $x_i$  代表位点重复单元的频率,  $n$  代表菌株数目, HGI 指数计算公式为  $D=1-\frac{1}{N(N-1)} \cdot \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$ ,  $N$  是样品菌株总数,  $S$  是基因类型的数量,  $n_j$  是属于第  $j$  种基因型的菌株,数量实验结果完全相同的菌株被定义为一个簇,成簇率计算公式为  $(n_c-c)/n$ ,  $n_c$  代

表成簇的菌株总数,  $c$  代表总簇数,  $n$  代表总样品菌株数.

3 结果

3.1 北京基因型的鉴定

四川省 211 株结核分枝杆菌应用 Spoligotyping 分型鉴定, 结果显示, 162 株(76.8%)属于北京基因型家族, 其中来源于 2008 年、2009 年、2010 年的菌株分别为 23 株、24 株、115 株. 此外, 150 株为典型北京型家族, 12 株为非典型北京型家族.

3.2 MIRU 位点多态性分析

不同的位点在不同菌株间存在明显的多态性对于本研究中的 162 株北京型菌株, 分辨指数最高的位点为 VNTR 4052(0.834), VNTR 0424、VNTR 2163b、VNTR 2996、VNTR 3192、VNTR 3690 和 VNTR 4348 等 6 位点的分辨力较高( $HGI > 0.7$ ), 而 VNTR 0802、VNTR 0960、VNTR

1644、VNTR 1955 和 VNTR 3007 等 5 个位点的分辨力相对较差( $0.4 > HGI > 0.7$ ), 见表 1.

3.3 聚类分析

标准 12 位点组合的 MIRU-VNTR 基因分型方法对 162 株结核分支杆菌进行分析, 见图 1a, HGI 指数为 0.99546, 其中独特的基因型为 114 种, 获得北京基因亚型 132 种, 成簇数目和成簇率分别为 48 株和 18.5%. 当使用赵于丁等<sup>[7]</sup>报道的 12 位点进行分析时, HGI 为 0.99985, 独特的基因型增多到 158 种, 北京基因亚型增至 160 种, 成簇数目和成簇率都显著降低, 分别为 4 株和 1.2%, 见图 1b 选用 7 个 VNTR 位点(VNTR 0424、VNTR 2163b、VNTR 2996、VNTR 3192、VNTR 3690、VNTR 4052 和 VNTR 4348)分析, 见图 1c, 获得 156 种独特的基因型和 3 个基因簇, 即获得 159 种北京基因亚型, 成簇率为 1.9%, HGI 为 0.99977, 不同分型方法的比较见表 2.

表 1 MIRU-VNTR 12 位点及其 HGI  
Tab. 1 The polymorphism and HGI index of 12 VNTRs

序号	基因组位置	VNTR 位点	等位基因数	拷贝数	HGI
1	H37RV-VNTR-0424	Mtub 04	6	0-6	0.7109
2	H37RV-VNTR-0802	MIRU 40	6	0-5	0.5993
3	H37RV-VNTR-0960	MIRU 10	5	0-4	0.6237
4	H37RV-VNTR-1644	MIRU 16	4	1-4	0.4340
5	H37RV-VNTR-1955	Mtub 21	8	3-7, 9-10, 14	0.6955
6	H37RV-VNTR-2163-b	QUB 11b	9	1-7, 19, 21	0.7781
7	H37RV-VNTR-2996	MIRU 26	9	1, 3-10	0.7122
8	H37RV-VNTR-3007	MIRU 27	5	0-4	0.5062
9	H37RV-VNTR-3192	MIRU 31	8	1-8	0.7803
10	H37RV-VNTR-3690	Mtub 39	9	0-8	0.7272
11	H37RV-VNTR-4052	QUB 26	12	0-11	0.8338
12	H37RV-VNTR-4348	MIRU 39	6	0-5	0.7571

4 讨论

此文旨在评估 VNTR 位点对于中国四川地区北京型结核分枝杆菌的适用性, 以便得到最佳的 VNTR 分型方法. 目前, 由于北京家族菌株与某些重要的致病特征有联系, 例如高传播、耐多药和高毒力等, 因此这种家族在全球已经引起了越来越多的关注<sup>[9, 11]</sup>. 2011 年, Y. Zhao 等报道<sup>[12]</sup>四川省的北京家族菌株为 63.4%(194/297), 说明北京基因型在四川省菌株中占有主导地位. 本研究从四川地区 2008~2010 年的临床结核分枝杆菌中随机选取了 211 株菌, 通过 Spoligotyping 分型方

法鉴定, 北京基因型占 76.8%(162 株), 结果与上述报道一致, 证明北京基因型在四川地区流行的优势地位. 对四种一线抗结核药物的耐药性检测分析后, 我们发现 162 株北京型中单一耐药率为 20.0%, 耐多药(MDR)比率为 27.2%, 其它模式的耐药率为 11.7%, 此结果远高于 2007 年全国流行病学调查中全国耐药平均水平<sup>[13]</sup>, 表明四川地区北京家族耐药情况比较严重, 同时也暗示北京型结核分枝杆菌的流行使四川地区的流行病学调查面临严峻的挑战.

本研究分析了 VNTR 位点的基因多态性, 不同位点之间多态性差异较大, HGI 变化范围为



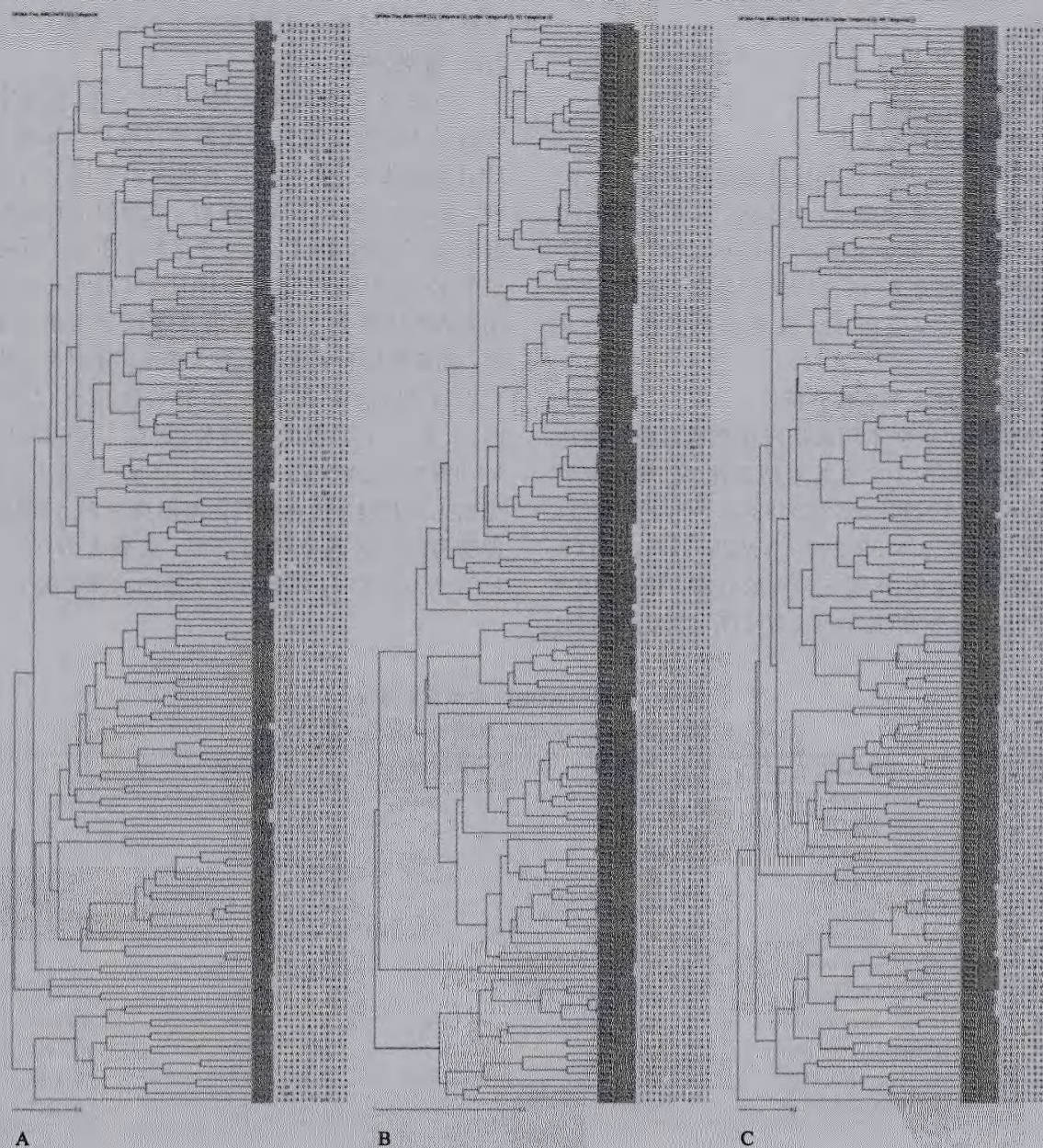


图 1 四川地区 162 株结核分枝杆菌北京基因型的聚类分析图

A、B、C 分别为三种不同 VNTR 位点组合的聚类图谱：A：VNTR 12 位点从左至右依次为：VNTR 154、VNTR 580、VNTR 802、VNTR 960、VNTR 1644、VNTR 2059、VNTR 2531、VNTR 2687、VNTR 2996、VNTR 3007、VNTR 3192、VNTR 4348，B：12 位点从左至右依次为：VNTR 0424、VNTR 1955、VNTR 802、VNTR 960、VNTR 1644、VNTR 3690、VNTR 2163b、VNTR 4052、VNTR 2996、VNTR 3007、VNTR 3192、VNTR 4348，C：7 位点从左至右依次为：VNTR 0424、VNTR 4052、VNTR 3690、VNTR 2163b、VNTR 4348、VNTR 2996、VNTR 3192

Fig. 1 Dendrogram of 162 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family from Sichuan

A: orders of 12 VNTRs from left to right are VNTR 154, VNTR 580, VNTR 802, VNTR 960, VNTR 1644, VNTR 2059, VNTR 2531, VNTR 2687, VNTR 2996, VNTR 3007, VNTR 3192, VNTR 4348. B: orders of 12 VNTRs from left to right are VNTR 0424, VNTR 1955, VNTR 802, VNTR 960, VNTR 1644, VNTR 3690, VNTR 2163b, VNTR 4052, VNTR 2996, VNTR 3007, VNTR 3192, VNTR 4348. C: orders of 7 VNTRs from left to right are VNTR 0424, VNTR 4052, VNTR 3690, VNTR 2163b, VNTR 4348, VNTR 2996, VNTR 3192.



表 2 不同分型方法在 162 株北京型菌株中的分辨能力  
Tab. 2 The discrimination of different genotyping methods among 162 isolates

分型方法	独特类型数	成簇菌株数	成簇数	类型数	成簇率(%)	HGI
Spoligotyping	0	162	4	4	97.5	0.14140
VNTR 12loci <sup>a</sup>	114	48	18	132	18.5	0.99546
VNTR 12loci <sup>b</sup>	158	4	2	160	1.2	0.99985
VNTR 7 loci	156	6	3	159	1.9	0.99977

<sup>a</sup>12 位点分别为: VNTR 154、VNTR 580、VNTR 802、VNTR 960、VNTR 1644、VNTR 2059、VNTR 2531、VNTR 2687、VNTR 2996、VNTR 3007、VNTR 3192、VNTR 4348; <sup>b</sup>12 位点分别为: VNTR 0424、VNTR 1955、VNTR 802、VNTR 960、VNTR 1644、VNTR 3690、VNTR 2163b、VNTR 4052、VNTR 2996、VNTR 3007、VNTR 3192、VNTR 4348.

0.434~0.834, 其中 VNTR 4052(QUB26)的多态性最高,VNTR 0424、VNTR 2163b、VNTR 2996、VNTR 3192、VNTR 3690 和 VNTR 4348 等位点存在较高的多态性,这与 Y. Zhao 等研究结果基本一致. 国际通用的标准 12 位点组合的分辨力为 0.9956,成簇率为 18.5%,由此表明,标准的 12 位点分型方法在北京家族菌株分型中受到一定限制,新选用的 12 位点组合提高了分辨力(HGI=0.9998),同时成簇率较标准的 12 位点也显著降低(1.2%),两种组合差异的原因是由于后一种 12 位点方法中引用的 5 个多态性较高的 VNTR 位点(VNTRs 0424、1955、2163b、3690 和 4052, HGI 都大于 0.6)代替了前一种 12 位点方法中的 5 个 VNTR 位点(除 VNTR 2059 外, VNTRs 0154、0580、2531 和 2684 等位点, HGI 均小于 0.3). 以上结果表明,通过不同位点间的合理组合,可以有效地提高 MIRU-VNTR 分型对北京基因型菌株的分辨能力.

本研究选用了 7 个分辨指数大于 0.7 的 VN-TR 位点进行组合,经分析发现 VNTR-7 分型方法对北京型菌株的 HGI 为 0.9998,成簇率为 1.9%,VNTR-7 对北京家族的分辨能力与新提出的 VNTR-12 位点组合相比只有很小的差异. 由此可见,这种位点组合能够有效地对四川地区北京型菌株进行基因分型,这是因为 VNTR-12 中除 VNTR-7 之外的 5 个 VNTR 位点只针对所有菌株时才具有较高的分辨能力,并不能进一步区分北京型菌株,这些位点可能与北京家族特有的进化有关,但具体的机制有待进一步研究. 此外,通过 VNTR-7 聚类分析我们发现了三种北京型亚型,分别为 3446273、4844474 和 4834474,它们可能是四川地区北京家族中具有潜在传播能力的菌株,四川地区的结核病监控可以加强对此类菌株的关注.

目前,有报道称使用基因分型标准方法 IS 6110 研究结核病近期传播会导致评估结果偏高<sup>[6]</sup>, Van Deutekom 等的研究表明 MIRU-VN-TR 分型方法调查结核分枝杆菌的传播比 IS 6110 限制性片段长度多态性更加可靠<sup>[14]</sup>. 四川省作为北京型结核分枝杆菌流行的地区,本研究对比分析了两种 12 位点组合分型方法针对四川地区北京型家族的适用性. 结果表明,新提出的 VNTR-12 方法明显优于标准的 12 位点分型方法;此外,通过筛选出分辨能力大于 0.7 的位点组合成的 VN-TR-7 具备了新 VNTR-12 方法分辨力上的优点,同时大大减少了工作量,可以作为四川北京型菌株的一线分型方法. 本研究对四川地区流行的北京家族结核病快速诊断具有一定的应用价值. 由于本实验中菌株来源的病人之间缺少流行病学信息,因此在流行病传播调查中存在一定的限制,我们期待后续关于北京型结核分枝杆菌流行地区和国家开展 VNTR-7 和 VNTR-12 的评估调查.

参考文献:

[1] van Soolingen D, Qian L, de Haas P E, *et al.* Pre-dominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia[J]. J Clin Microbiol, 1995. 33(12): 3234.

[2] Kremer K, Glynn J R, Lillebaek T, *et al.* Defini-tion of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tu-berculosis* on the basis of genetic markers[J]. J Clin Microbiol, 2004. 42(9): 4040.

[3] Lan N T, Lien H T, Tung le B, *et al.* *Mycobacte-rium tuberculosis* Beijing genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam[J]. Emerg Infect Dis, 2003. 9(12): 1633.

[4] 杨筠,董海燕,李定越,等. 四川省 106 株结核分枝杆菌 Spoligotyping 基因分型研究[J]. 医学研究杂志, 2012. 41(5): 28.

[5] Yang C, Luo T, Sun G, *et al.* *Mycobacterium tu-*

- berculosis* Beijing strains favor transmission but not drug resistance in China[J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 55(9): 1179.
- [6] 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]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(12): 4498.
- [7] 赵于丁, 冯钦, 罗涛, 等. 应用多位点数目可变串联重复序列对四川地区结核分支杆菌的基因分型[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2012, 49(4): 909.
- [8] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(4): 907.
- [9] Caminero J A, Pena M J, Campos-Herrero M I, *et al.* Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(7): 1165.
- [10] Cox H S, Kubica T, Doshetov D, *et al.* The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia[J]. *Respir Res*, 2005, 6: 134.
- [11] Lopez B, Aguilar D, Orozco H, *et al.* A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes[J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 133(1): 30.
- [12] Zhao Y D, Feng Q, Tang K, *et al.* The population structure of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Sichuan in China[J]. *Infect Genet Evol*, 2012, 12(4): 718.
- [13] Zhao Y, Xu S, Wang L, *et al.* National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(23): 2161.
- [14] van Deutekom H, Supply P, de Haas P E, *et al.* Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(9): 4473.