

# VNTR分子指纹分型法在 结核分枝杆菌菌株识别中的应用

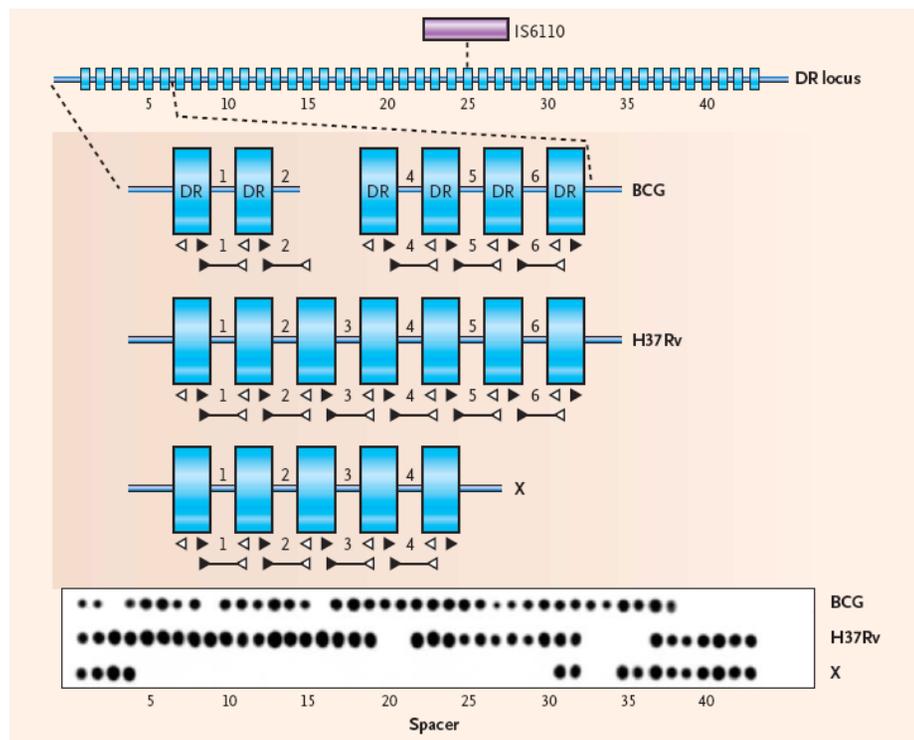
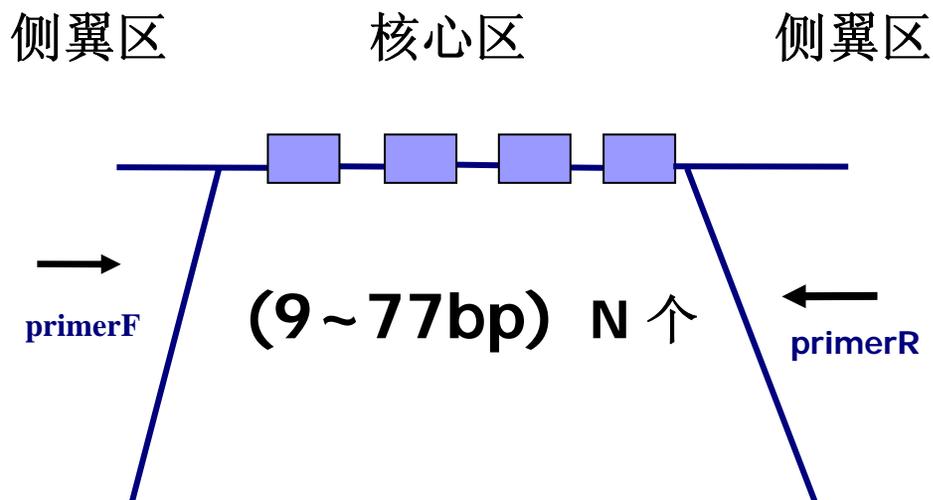
上海复旦大学附属华山医院传染科（金嘉琳、张文宏、翁心华）；  
上海市复旦大学遗传所（姜昕）；上海市肺科医院（胡忠义）

国家“十五”科技攻关计划资助项目

# 背 景

- 分子指纹图谱分析研究发现在结核耐药菌株的感染与传播中北京基因型菌株是主要的组成成分，约占全世界结核菌株1/4，在中国更是占了80%以上的比例
- 由于北京基因型菌株常常与耐多药菌株的流行相关，早期识别十分重要
- 我们采用传统的Spoligotyping（间隔区寡核苷酸分型）方法和新的VNTR（多位点可变串联重复序列）方法进行基因分型，比较两种基因分型方法的优劣。

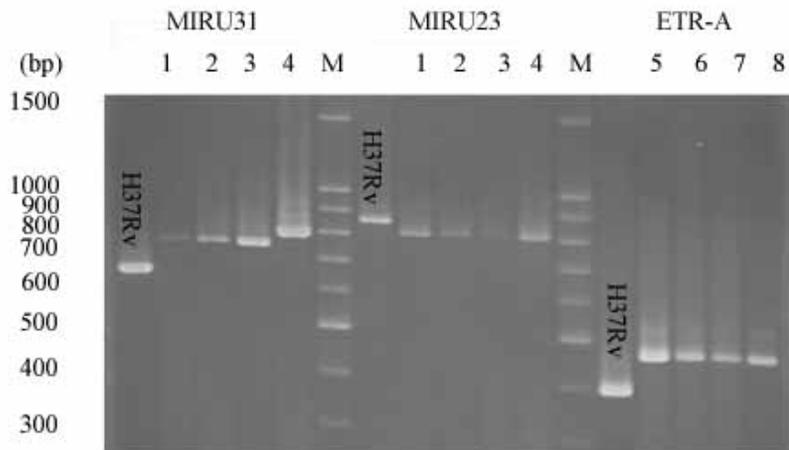
# VNTR和Spoligotyping原理示意图



# 材料与amp;方法

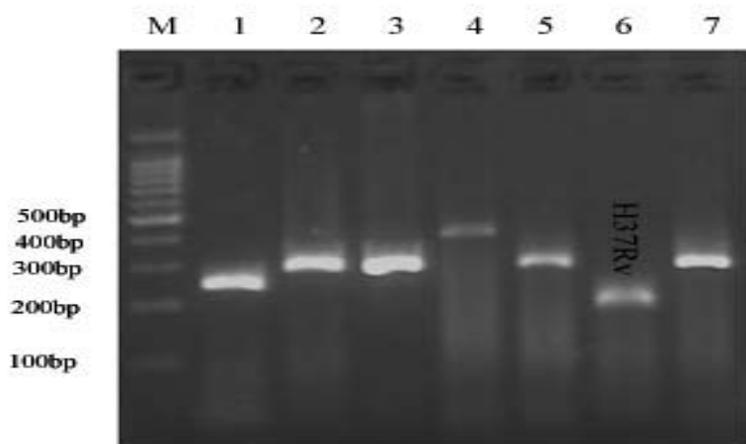
- 菌株来源及药敏结果
- 基因组DNA的提取
- VNTR分型
- Spoligotyping分型

# VNTR凝胶电泳图



- 图示PCR产物凝胶电泳部分结果，DNA样品（包括H37Rv标准株）分别从左到右以MIRU31, MIRU23, ETR-A三个位点的引物分别扩增，100bp DNA ladder marker 作为参照，1-8为样品编号。等位片段大小及所含重复单位数目可从中推断出来。例如，样品1等位片段大小在图中可以看出在MIRU31位点为757bp，在这个位点H37Rv标准株的等位片段大小为651bp（3个重复片段），这个位点的重复单位序列长度为53bp，因此样品1含有5个重复单位。

# 等位基因片段大小 与所含重复序列数目对应关系

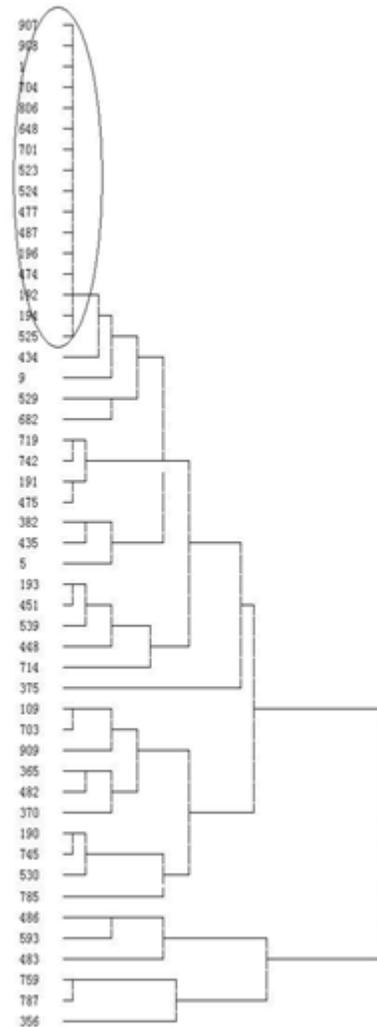


- 该图为MIRU40位点各等位片段，泳道6为H37Rv株扩增产物为199bp，对应重复序列数目为1；泳道1菌株的等位片段大小为253bp，对应重复序列数目为2；泳道2，3，5，7菌株的等位片段大小为307bp，对应重复序列数目为3；泳道4菌株的等位片段大小为415bp，对应重复序列数目为5。M：100bp DNA ladder。

# 基因树成簇性分析

## ■ VNTR方法基因分型结果

- 12个位点均具有多态性，重复序列数目2 ~ 7不等
- 50株菌株VNTR方法共分为29种基因型，其中22种基因型只含有一个菌株
- 7种基因型含有2或2株以上菌株，称为“簇”
- 最大的一簇含有16株菌株



# VNTR与传统Spoligotyping方法的比较

## ■ Spoligotyping方法基因分型结果

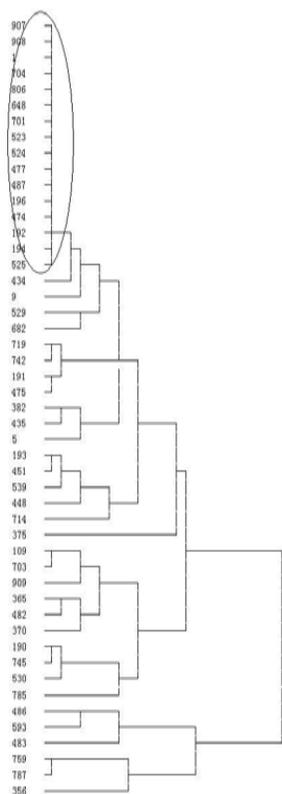
- 44株（44/50，88%）为北京基因型菌株
- 分为2种基因型，一种只含有一株菌株，另一种含有43株菌株
- 43株Spoligotyping基因型相同的北京基因型菌株以VNTR方法分为24种不同的基因型，其中18种基因型只含有一个菌株，6种基因型中菌株成“簇”，最大的一簇含有16株菌株

# VNTR方法和Spoligotyping方法分型结果

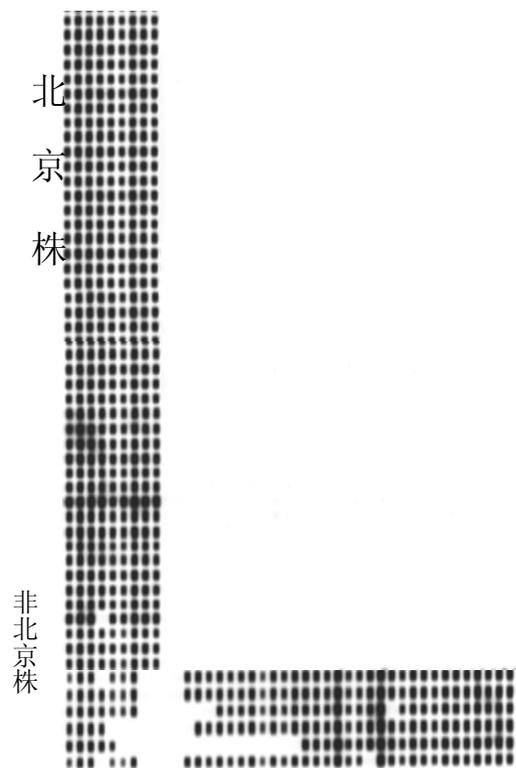
分型菌株数 (n)	分型方法 (位点数目)	只含一个菌株的基因型数量	成簇数	成簇菌株数 (%)	最大簇中的菌株数	簇平均大小	PI	P
所有菌株 (50)	Spoligotyping (43)	8	1	43 (86)	43	43	0.241	NA
	ETR VNTR (5)	8	5	42 (84)	30	8.4	0.622	0.210
	MIRU VNTR (9)	19	8	31 (70)	16	3.9	0.877	0.262
	所有位点 VNTR (12)	22	7	28 (56)	16	4	0.888	0.232
北京基因型菌株 (44)	Spoligotyping (43)	1	1	43 (98)	43	43	0.044	NA
	ETR VNTR (5)	4	4	40 (91)	30	10	0.515	0.117
	MIRU VNTR (9)	17	6	27 (61)	16	4.5	0.846	0.165
	所有位点 VNTR (12)	18	6	26 (59)	16	4.3	0.848	0.142

注: PI为多形性指数, 计算公式为:  $1 - \sum f^2$  (f 即菌株中等位片段频率); P为相应各个位点多形性指数的平均值; NA 为无数据。

# VNTR方法和Spoligotyping方法分型结果比较



VNTR



Spoligotyping

50株临床菌株: Spoligotyping方法分型有44株(88%)菌株为北京基因型。Spoligotyping基因型相同的43株菌株以VNTR方法可分为不同的基因型24种

# VNTR分型法对北京基因型菌株分辨率高

- Spoligotyping的方法进行基因分型发现有88%（44/50）的菌株属于北京基因型家族，北京基因型菌株目前仍然是中国主要的流行基因型。
- Spoligotyping对北京基因型菌株的分辨率较低。
- VNTR法分辨率高，可以弥补Spoligotyping的不足，把菌株加以进一步区分，利于对菌株来源、传播关系等的分析，获得有用的信息。

# VNTR分型方法的优点和存在问题

- VNTR（数目可变串联重复单元）
  - 对DNA的质量、数量要求低
  - 简便、快速（PCR的速度）
  - 重复性高
  - 标准化，便于各个不同的实验室之间进行比较。
    - 不同的研究中所采用位点还没有实现统一和标准化
    - 各个位点PI的差别比较大
    - 有必要进行本地区的流行病学资料调查。

# 结 论

- 鉴于VNTR的优点：方便、快速，较高的分辨率，VNTR可以作为进行结核杆菌流行病学调查中最初的普查工具
- 结合Spoligotyping鉴定是否为北京基因型菌株。
- VNTR 的扩展应用
  - 结核分支杆菌：交叉污染鉴定、流行病学追踪、结核控制的评估
  - 布氏杆菌分型
  - 肠出血性大肠杆菌的识别
  - 真菌



谢谢!