

结核分枝杆菌中插入序列的研究

蔡 宏

李君莲

(新疆畜牧科学院兽医研究所 乌鲁木齐 830000) (新疆结核病研究所 乌鲁木齐 830001)

武 坚

(新疆畜牧科学院农业部畜牧兽医生物技术重点开放实验室 乌鲁木齐 830000)

张曼夫

陈永福

(中国农业大学生物学院 北京 100094) (中国农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094)

提 要 用人型复合分枝杆菌的特异插入序列 IS6110 和 IS1081 制备探针,对 5 种限制性内切酶消化的结核分枝杆菌 DNA 进行杂交。结果表明,经 PvuII 酶消化的结核分枝杆菌 DNA,用 IS6110 制备的探针进行杂交呈现高度多态性,说明 IS6110 对于人型复合分枝杆菌分型研究和结核病流行病学研究具有很大价值。用 IS6110 制备的 317bp 探针对 46 株人结核分枝杆菌分离株多态性分析研究证实,这些菌株呈现高度 DNA 多态性,而且所含拷贝数也极为不同,一般含 7~18 个拷贝。

关键词 结核分枝杆菌,插入序列,限制性酶切片长度多态性(RFLP)

分类号 Q939[·93] **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0120-26

结核分枝杆菌分离株鉴定与分型研究,对结核病的快速诊断、流行病学调查和监控具有重要意义。研究表明,人型复合分枝杆菌(包括人结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌、非洲型分枝杆菌以及田鼠分枝杆菌)中存在一些插入序列(IS)可做为探针用于结核病的诊断,同时采用限制性酶切片长度多态性(RFLP)技术对人型复合分枝杆菌进行分型研究。研究最广泛的是与肠杆菌科中插入片段相类似的插入基因片段,包括 IS6110、IS986 和 IS987。这些基因片段都只存在于人型复合分枝杆菌中,并以多拷贝形式出现。在人结核分枝杆菌基因组中,IS6110 至少有 6~20 个拷贝^[1],同时少数菌株中含单个拷贝甚至不含该拷贝^[2],在牛结核分枝杆菌分离株中含有 1~5 个拷贝^[1]。

近年发现人型复合分枝杆菌中还含有第二类插入序列 IS1081,它与 IS6110 极为不同,但与金黄色葡萄球菌中 IS256 相似。IS1081 也只存在于人型复合分枝杆菌中,拷贝数为 6 个。

由于以上插入序列仅存在于人型复合分枝杆菌中,故在聚合酶链式反应(PCR)中可作为 DNA 模板用于临床标本的结核病诊断。此外由于第一类插入序列在结核杆菌基因组的位置与拷贝数不同,可用 RFLP 技术对人型复合分枝杆菌进行分型^[4]。作者采用人型复合分枝杆菌染色体 DNA 中的特异插入序列 IS6110 和 IS1081 为模板,分别选择位于 IS6110 中 884~865 和 568~588bp 处的两个片段^[5]和 IS1081 中 438~459 和 664~685bp 处的两个片段为引物^[3],利用 PCR 法分别扩增出 317bp 和 248bp 的特异基因片段,将其克隆到 pUC19 载体,经荧光素标记,采用 Southern 转印技术对标准的人型复合分

枝杆菌以及临床分离株进行鉴定与分型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 :人标准结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)H37Ra 和 H37Rv 株,牛结核分枝杆菌(*M. bovis*),草分枝杆菌(*M. phlei*),偶发分枝杆菌(*M. fortuitum*),转黄分枝杆菌(*M. flavescens*),胃分枝杆菌(*M. gastris*),瘰疬分枝杆菌(*M. scrofulaceum*),蟾分枝杆菌(*M. xenopi*),斯氏分枝杆菌(*M. szulgai*)的国际标准菌株均购自北京结核病胸部肿瘤研究所细胞免疫室,人结核分枝杆菌临床分离株由新疆结核病研究所检验室经培养和鉴定后提供。

1.1.2 化学试剂 均为国产。

1.1.3 内切酶类 购自美国 Promega 公司。

1.1.4 试剂盒 购自 Amersham 和 Perkin-Elmer 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 :将标准菌株转移至研磨管中,加少许磷酸盐缓冲液用磨棒充分磨成悬液,转移至改良的罗氏培养基 37℃ 培养 4~8 周。对临床病人痰液结核分枝杆菌分离是将痰液置 4% NaOH 溶液(含 1%的 N-乙酰-L-半胱氨酸)中混匀,室温静置 20min,最终制成 20mL pH6.8 的磷酸盐缓冲液,8000r/min 离心 20min,弃上清液,沉淀悬浮于 1mL 磷酸盐缓冲液中,取 0.5mL 或 1mL 接种于改良罗氏培养基,于 37℃ 培养 4~8 周。

1.2.2 染色体 DNA 提取 :细菌培养物悬浮于 20mL TE 缓冲液(pH8.0)中,80℃ 灭活 30min,8000r/min 离心 20min 收集细菌。加 5mL 裂解液(25%蔗糖,50mmol/L Tris-HCl, pH8.0,50mmol/L EDTA;500μg/mL 溶菌酶)于 37℃ 1h;加 5mL 新配制的消化液(100mmol/L Tris-HCl, pH8.0,Proteinase K 400μg/mL,1% SDS)55℃ 2h。加 2mL 5mol/L NaCl 酚/氯仿抽提,乙醇沉淀,离心收集沉淀,溶于 TE。

1.2.3 引物合成 选择位于 IS6110 中 884~865 和 568~588 碱基对处的引物 TB41 (5'-CCT, GCG, AGC, GTA, GGC, GTC, GG-3')和 TB43 (5'-TCA, GCC, GCG, TCC, ACG, CCG, CCA-3')选择位于 IS1081 中 438~459 和 664~685 碱基对处的引物 I (5'-ACA, GGC, GAG, CCC, GGA, TCT, GCT, G-3')和引物 II (5'-GTT, CAG, CTC, GCT, TGC, GGC, GCT, G-3')。上述引物均由北京大学生物系合成。

1.2.4 人结核分枝杆菌特异性片段的 PCR 扩增 :以制备的染色体 DNA 为模板,利用合成引物在 Taq DNA pol 作用下扩增。反应体系及条件如下:50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl(pH8.3), 2.5mmol/L MgCl₂, dNTP 各 200μmol/L, 引物各 1.0μmol/L, Taq DNA pol 2.5u, 模板 DNA 1μg, 加水至 100μL。在 PE-9600 扩增仪上进行 35 次下述循环:94℃ 2min 20s, 72℃ 3min 25s。反应结束将 PCR 产物降至 0℃, 取 20μL 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 探针制备与标记 :将 IS6110 的特异 PCR 扩增产物 317bp 和 IS1081 的特异 PCR 扩增产物 248bp 分别用作杂交探针,用 BamH I 分别消化含 317bp 和 248bp 的重组 pUC19 DNA 成线性,纯化后用荧光素标记 dUTP 随机引物试剂盒标记:100ng DNA 溶于

20 μ L水中,100 $^{\circ}$ C变性5min,迅速置冰上冷却,加入10 μ L的dNTP,5 μ L引物,15 μ LH₂O,1 μ L Klenow 酶,37 $^{\circ}$ C 4h。

1.2.6 Southern 转印杂交:电泳条件:取1 μ g的人结核分枝杆菌标准菌株DNA分别用EcoR I, Pst I, Sal I, BamH I, Pvu II 酶消化,取2 μ g临床分离株DNA用Pvu II于37 $^{\circ}$ C消化4h,20mA 电流1%琼脂糖电泳过夜。以Supercoiled Ladder DNA/Pvu II, ϕ 174/Hae II与 λ /Hind III的混合液及结核分枝杆菌标准毒株Mt14323作为标准对照。

转印:采用真空转印装置转印约1.5h,用0.4mol/L NaOH固定10~20min,80 $^{\circ}$ C烘烤2h。

分子杂交:将样品膜在60 $^{\circ}$ C~65 $^{\circ}$ C杂交液中预杂交1~2h,加入变性的DNA探针(10ng/mL)于65 $^{\circ}$ C振荡12h。杂交后用1 \times SSC/0.1% SDS漂洗膜1min。在60 $^{\circ}$ C~65 $^{\circ}$ C下用1 \times SSC/0.1% SDS和0.5 \times SSC/0.1% SDS分别漂洗3次(10min/次),然后进行封闭,结合抗碱性磷酸酶的抗体复合物(1:5000稀释),最后用0.3% Tween-20漂洗3次(15min/次),均匀喷涂检测剂,放暗盒,X光片曝光约4h,观察结果。

2 结果

2.1 探针杂交法验证 IS6110 和 IS1081 在不同的分枝杆菌中存在情况

为了研究在分枝杆菌属中IS6110和IS1081的存在情况,采用上述的317bp探针和248bp探针,对用Pvu II消化的人结核分枝杆菌株H37Ra和H37Rv、牛结核分枝杆菌、草分枝杆菌、偶发分枝杆菌、转黄分枝杆菌、胃分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、蟾分枝杆菌、斯氏分枝杆菌的DNA进行Southern杂交。结果表明以IS6110和IS1081为模板制备的探针只与人结核分枝杆菌和牛结核分枝杆菌DNA杂交且呈现多条带型,这一结果说明IS6110和IS1081仅限存在于人型复合分枝杆菌之中(图1,2)。

2.2 PCR 法验证 IS6110 和 IS1081 在不同分枝杆菌中的存在情况

分别以IS6110和IS1081中的一对引物对人标准结核分枝杆菌H37Rv、H37Ra、牛结核分枝杆菌、鸟分枝杆菌、草分枝杆菌、偶发分枝杆菌、转黄分枝杆菌、副结核分枝杆菌、胃分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、蟾分枝杆菌、斯氏分枝杆菌DNA为模板进行PCR扩增。结果发现IS6110中的引物可扩增出人结核分枝杆菌和牛结核分枝杆菌DNA中的一条317bp片段,而其他分枝杆菌均不出现扩增带;与此同时,IS1081中的引物可扩增出人、牛结核分枝杆菌DNA中的一条248bp片段,而其他分枝杆菌则未出现扩增带(图3,4)。此外,来自临床的48份人结核分枝杆菌分离株DNA在PCR扩增中也出现317bp扩增带。上述结果表明,IS6110和IS1081在人、牛结核分枝杆菌诊断中可被选为特异性模板之用。

2.3 IS6110 在结核分枝杆菌中的拷贝数和 RFLP 分析中的应用

使用限制性内切酶Pvu II对临床分离株DNA进行消化,该酶在1.35kb长的IS6110人结核分枝杆菌插入序列中只有1个位点^[6]。用位于Pvu II切点右侧的317bp DNA探针杂交,可见50%的阳性杂交带,条带的减少便于分析。进一步分析46株人结核分枝杆菌分离株(图5),表明在这些菌株中呈现高度的多态性,经统计不同的人型复合分枝杆菌中IS6110的拷贝数也极为不同,分布范围为1~17,一般含7~18个拷贝。

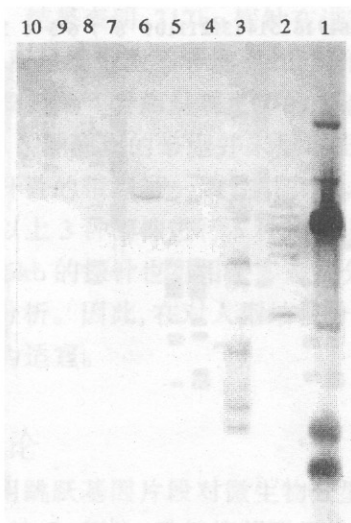


图 1 采用 Southern 杂交法验证插入序列 IS6110 在不同分枝杆菌中的存在情况

Fig.1 Occurrence of IS6110 in various mycobacterial species determined by Southern blot analysis of Pvu II-digested chromosomal DNA from different species hybridized with the labeled 317bp probe

1. λ /Hind III marker; 2. H37Ra DNA; 3. H37Rv DNA; 4. *M. phlei* DNA; 5. *M. bovis* DNA; 6~10. Other 6 DNA of mycobacterial species.

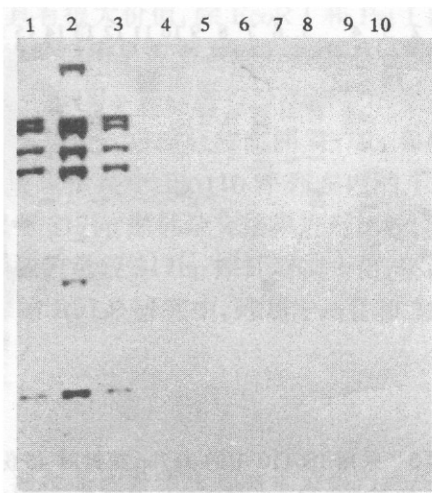


图 2 采用 Southern 杂交法验证插入序列 IS1081 在不同分枝杆菌中的存在情况

Fig.2 Occurrence of IS1081 in various mycobacterial species determined by Southern blot analysis of Pvu II-digested chromosomal DNA from different species hybridized with the labeled 248bp probe

1. H37Ra DNA; 2. H37Rv DNA; 3. *M. bovis* DNA; 4~10. Other 7 DNA of mycobacterial species.

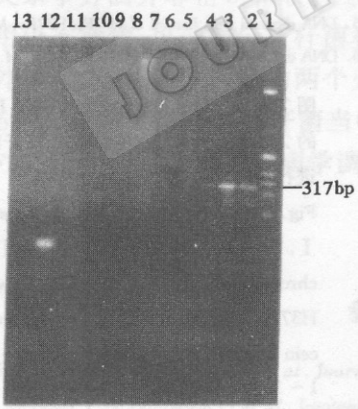


图 3 采用 PCR 法扩增确定插入序列 IS6110 在不同分枝杆菌中的存在情况

Fig.3 Occurrence of IS6110 in various mycobacterial species determined by PCR

1. pBR322/Hinf I marker; 2. H37Rv template; 3. H37Ra template; 4. *M. bovis* template; 5~13. Other 9 templates of mycobacterial species.

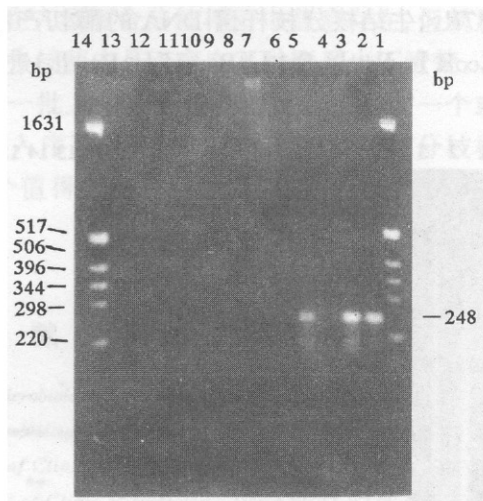


图 4 采用 PCR 法扩增确定插入序列 IS1081 在不同分枝杆菌中的存在情况

Fig.4 Occurrence of IS1081 in various mycobacterial species determined by PCR

1. pBR322/Hinf I marker; 2. H37Rv template; 3. H37Ra template; 4. *M. phlei* template; 5. *M. bovis* template; 6~13. Other 8 templates of mycobacterial species.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

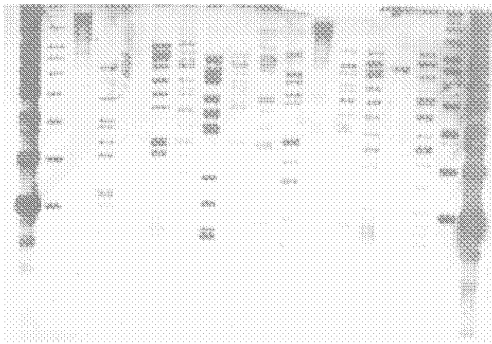


图 5 采用 IS6110 中的 317bp 探针针对 46 份新疆结核病人分离株进行 RFLP 分析

Fig. 5 RFLP analysis of Forty-six isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Xinjiang Institute of TB. Southern blotting was carried out by using 317bp probe

19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

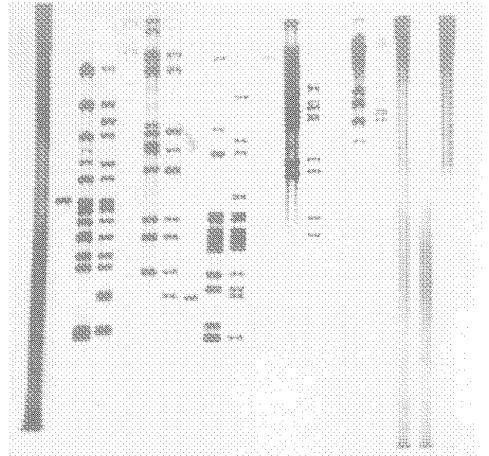


图 6 用荧光素标记的插入序列 IS6110 中的 317bp 探针针对人、牛标准结核分枝菌株进行 RFLP 分析

Fig. 6 Southern blot analysis of EcoRI, PstI, SalI, BamHI, PvuII digested chromosomal DNA of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, H37Rv and *M. bovis* with the fluorescein labeled 317bp probe

- 1~3 19. Standard marker(λHindIII, ϕ174, λHindIII & ϕ174);
- 4~6. DNA digested with EcoRI of H37Ra, H37Rv, *M. bovis*;
- 7~9. DNA digested with PstI of H37Ra, H37Rv, *M. bovis*;
- 10~12. DNA digested with SalI of H37Ra, H37Rv, *M. bovis*;
- 13~15. DNA digested with BamHI of H37Ra, H37Rv, *M. bovis*;
- 16~18. DNA digested with PvuII of H37Ra, H37Rv, *M. bovis*.

2.4 IS6110 和 IS1081 在人、牛结核分枝杆菌 RFLP 分析中的应用

在对人、牛结核分枝杆菌标准菌株的 RFLP 分析中,采用上述的 317bp 和 248bp 探针,对人型结核分枝杆菌标准株 H37Ra、H37Rv、牛结核分枝杆菌 DNA 的酶切产物(EcoR I, Pst I, Sal I, BamH I, Pvu II)进

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

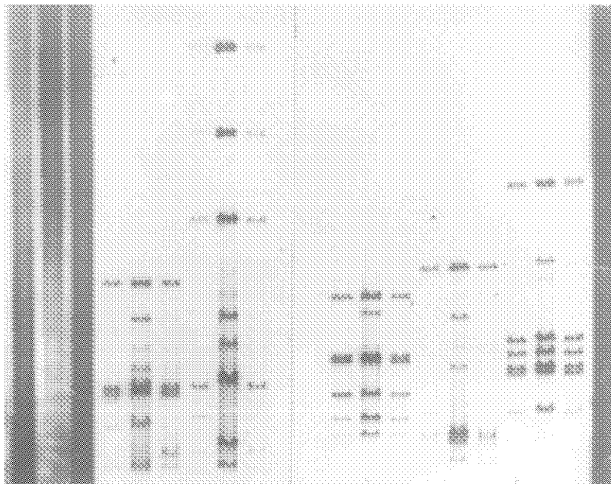


图 7 用荧光素标记的插入序列 IS1081 中的 248bp 探针针对人、牛结核分枝杆菌标准菌株进行 RFLP 分析

Fig. 7 The Southern blot analysis of EcoRI, PstI, SalI, BamHI, PvuII digested chromosomal DNA of *M. tuberculosis*, H37Ra, H37Rv & *M. bovis* with the fluorescein labeled 248bp probe

- 1~3, 19. Standard marker(λHindIII, ϕ174, λHindIII & ϕ174);
- 4~6. DNA digested with EcoRI of H37Ra, H37Rv, *M. bovis*;
- 7~9. DNA digested with PstI of H37Ra, H37Rv, *M. bovis*;
- 10~12. DNA digested with SalI of H37Ra, H37Rv, *M. bovis*;
- 13~15. DNA digested with BamHI of H37Ra, H37Rv, *M. bovis*;
- 16~18. DNA digested with PvuII of H37Ra, H37Rv, *M. bovis*.

行杂交。结果表明 317bp 探针在进行分型研究时具有很大价值,除 EcoR I 和 Pst I 消化 DNA 后所呈现带型不够理想外,其他三种酶产生的带型均呈现多态性。其中 Pvu II 的杂交带型较其他 4 种酶呈现更多的多态性(图 6)。而用 248bp 探针进行分型研究的意义不大,因为 5 种酶切的带型并未呈现出高度的多态性,并且人结核分枝菌株 H37Ra 和牛结核分枝杆菌的带型呈一致性(图 7)。此外我们也用包括整个 IS6110 序列在内的 1.6kb 探针对以上 3 种菌株进行 5 种酶切多态性分析,并与 317bp 探针杂交结果进行比较,发现尽管 1.6kb 的探针也可用于多态性分析研究,但带型数量较 317bp 探针增加一倍,不利于结果的分析。因此,在对人型结核分析杆菌分离株的 RFLP 研究中,选用 Pvu II 和 317bp 探针较为适宜。

3 讨论

利用跳跃基因片段对微生物分型令人不解,从遗传角度看这些基因具不稳定性,会引起移位、缺乏、倒位、重复等基因重排而造成多型性,然而 *C. albicans* 中的 DNA 重复序列和 *Corynebacterium diphtheriae* 以及结核分枝杆菌的插入序列在菌型分析和流行病学研究中却显示出极有价值^[6,7]。从我们及国外学者的研究中得知,这种插入序列对结核分枝杆菌分离株的分型研究呈现出的高度多态性,也说明这些插入序列可能极不稳定,而且在分枝杆菌中不停地移动^[7]。

本项研究证实 IS1081 仅存在于人型复合分枝杆菌,无论是探针杂交结果,还是 PCR 扩增结果都证实了这点,这与国外有关材料的报道结果并不尽一致。国外有些材料报道 IS1081 除存在于人型复合分枝杆菌中外,也存在于蟾分枝杆菌属的慢生菌中,二者之间在分类关系学方面并非密切相联。尽管 IS1081 在人型复合分枝杆菌中普遍存在,但其所起的作用仍不清楚,可见蟾分枝杆菌和人型复合分枝菌中是否存在某种联系也不清楚。

国外报道^[8],从澳大利亚的两个州分离到的一批人结核分枝杆菌菌株中只含一个或不含 IS6110,若是人结核分枝杆菌当中不含该插入序列,那么用 IS6110 进行结核分枝杆菌的 RFLP 研究和结核病流行病学调查就是一个值得考虑的问题,目前我们尚未遇到类似问题。

参 考 文 献

- [1] Skuce R A, Brittain D, Hughes M S *et al.* *Journal of Clinic Microbiology*, 1994, **32**(4): 2387~2392.
- [2] Kent L, McHugh T D, Billington O *et al.* *Journal of Clinic Microbiology*, 1995, **33**(9): 2290~2293.
- [3] Collins D M, Erasmuson S K, Diana M, Stephens *et al.* *Journal of Clinic Microbiology*, 1993, **31**(5): 1143~1147.
- [4] Soolingen D V, Hermans P W M, de Haas P E W *et al.* *Journal of Clinic Microbiology*, 1992, **30**(7): 1772~1777.
- [5] Nolte F S, Metchock B, McGowan J E *et al.* *Journal of Clinic Microbiology*, 1993, **31**(7): 1777~1782.
- [6] Soolingen D V, de Haas P E W, Haagsma J *et al.* *Journal of Clinic Microbiology*, 1994, **32**(10): 2425~2433.
- [7] Soolingen D V, Hermans P W M, de Haas P E W *et al.* *Journal of Clinic Microbiology*, 1991, **29**(11): 2578~2586.
- [8] Yuen L K W, Ross B C, Jackson K M *et al.* *Journal of Clinic Microbiology*, 1993, **31**(6): 1615~1618.

SPECIES IDENTIFICATION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* WITH INSERTION ELEMENTS

Cai Hong

(*Xinjiang Academy of Animal Science ,Institute of Veterinary ,Ürümqi 830000*)

Li Junlian

(*Xinjiang Institute of Tuberculosis ,Ürümqi 830001*)

Wu Jian

(*Xinjiang Academy of Animal Science ,Ministry of Agriculture Key Laboratory for Animal & Veterinary Biotechnology ,Ürümqi 830000*)

Zhang Manfu

(*China Agricultural University ,Biology College ,Beijing 100094*)

Chen Yongfu

(*China Agricultural University ,National Laboratory for Agribiotechnology ,Beijing 100094*)

Abstract The Insertion Sequence(IS) element IS6110 and IS1081 of *M. tuberculosis* complex were used as template to prepare probes for typing strains by means of restriction fragment length polymorphisms(RFLP). Chromosomal DNA of *M. tuberculosis* H37Ra ,H37Rv ,*M. bovis* digested with EcoR I ,Pst I ,Sal I ,BamH I ,Pvu II was subjected to Southern Blot analysis With labeled 317bp from IS6110 and 248bp from IS1081. The results indicated that for *M. tuberculosis* complex , IS1081 cannot be used to type strains ,IS6110 can be used to distinguish strains into broad groups and is an excellent epidemiological tool for studying outbreaks. An investigation of forty-six *M. tuberculosis* isolates by IS6110 RFLP revealed that *M. tuberculosis* strains not only are of highly polymorphic but also are present in multiple copies ranging from 7 to 18 copies.

Key words *M. tuberculosis* ,Insertion sequence(IS) ,RFLP