· 临床检验研究论著 ·

百日咳鲍特菌基因组多态性分析*

徐颖华，卫　辰，王丽婵，骆　鹏，侯启明，张庶民△

（中国食品药品检定研究院百白破疫苗和毒素室，卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室，北京 100050）

摘　要：目的　了解百日咳鲍特菌（简称百日咳杆菌）基因组特征。**方法**　应用百日咳杆菌等位基因分型法和多位点可变数量串联重复序列分析（MLVA）法分析百日咳杆菌基因多态性，同时对 2 种分型方法的多态性指数进行统计学分析。**结果**　百日咳黏附素（Prn）、支气管黏附因子（tcfA）和百日咳毒素基因上游启动子区域（ptxP）3 种等位基因序列分析结果显示，共发现 3 种等位基因组合型：Prn1/ptxP1/tcfA2、Prn2/ptxP3/tcfA2 和 Prn3/ptxP1/tcfA2，所占比例分别为 71.43%、19.05%和9.52%。MLVA 法将 21 株分离菌株分成了 12 个不同的 MLVA 型，MLVA-136 型和 MLVA-152 型为主要流行 MLVA 型，所占比例分别为 28.57%和 19.05%，并发现 1 种新 MLVA 型菌株。统计学分析表明 MLVA 法较等位基因分型法具有更高的分辨率。**结论**　国内部分地区百日咳杆菌流行菌株与欧洲其他国家不同，掌握百日咳杆菌分子流行病学的第一手资料，对有效预防和控制百日咳的流行以及制定新的百日咳疫苗免疫策略具有指导意义。

关键词：博德特菌，百日咳；　基因组；　多态观察，遗传

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2012.22.002　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2012)22-2691-04

Analysis of genomic polymorphisms of Bordetella pertussis isolates*

Xu Yinghua, Wei Chen, Wang Lichan, Luo Peng, Hou Qiming, Zhang Shumin△

(*Division of DTP vaccine and toxins, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Institutes of Food and Drug Control, Beijing* 100050, *China*)

Abstract: Objective　To investigate the genomic characterizations of B. pertussis isolates. **Methods**　Genomic polymorphisms of recent B. pertussis isolates were determined by two international universal molecular typing methods, allelic analysis and MLVA for B. pertussis. The diversity indexs of typing methods were analyzed statistically. **Results**　The sequencing analysis of pertacitn(Prn), tracheal colonization factor(tcfA) and pertussis toxin promoter region(ptxP) showed that three allelic profiles Prn1/ptxP1/tcfA2, Prn2/ptxP3/tcfA2 and Prn3/ptxP1/tcfA2 were found with the frequency of 71.43%, 19.05% and 9.52% in the strains analyzed, respectively. 21 isolates produced 12 different B. pertussis MLVA profiles, and a new profile was found. Main MLVA profiles were MLVA-136 and MLVA-152, accounted 28.57% and for 19.05% respectively. The results of statistical analysis suggested that MLVA were better than allelic analysis for molecular typing of B. pertussis. **Conclusion**　These results demonstrated that B. pertussis epidemic strains in some regions of China were different from those in European countries. These works could allow us to gain more insights into the molecular epidemiological patterns of the B. pertussis strains, facilitating for a better control of pertussis spread and new vaccine prevention strategies in China.

Key words: Bordetella pertussia;　genome;　polymorphism, genetic

百日咳是由百日咳鲍特菌（简称百日咳杆菌）引起的一种婴幼儿急性呼吸道传染病。尽管中国自 20 世纪 90 年代以来国内百日咳疫苗接种覆盖率一直维持在较高水平，但每年仍有不少百日咳病例的报道，局部地区甚至出现暴发流行，给人民健康造成严重威胁[1-2]。目前，国内对百日咳杆菌的分子特征研究较少，为了加强传染病防控和病原溯源的能力，亟需了解百日咳杆菌流行菌株的基因组变异特点和分子流行趋势。脉冲场凝胶电泳法（PFGE）作为分子流行病学研究工具自 20 世纪 90 年代用于百日咳杆菌分子流行病学的研究[3]，但该方法要求分析的样品为活菌，且因为缺乏国际统一标准化实验方案，PFGE 分型结果不能直接在实验室之间进行比较[4]。为了进一步探讨全球百日咳杆菌分子进化特征，国际同行建立了多种通用基因多态性和病原鉴定、溯源的 DNA 分型方法及相关数据库[5-7]。本研究采用包含 6 个可变数量串联重复序列（VNTR）位点的多位点可变数量串联重复序列分析（MLVA）法，并结合百日咳黏附素（Prn）、气管黏附因子（tcfA）和百日咳毒素基因上游启动子区域（ptxP）等位基因序列分析法对国内部分地区分离的百日咳杆菌菌株进行多态性分析，以了解国内实施百日咳疫苗接种多年后，流行菌株在分子水平的动态变化。

1　材料与方法

1.1　菌株　收集来自河北和北京地区 1997～2007 年分离的百日咳杆菌菌株，共 21 株。

1.2　仪器与试剂　PCR 仪为日本 ASTEC 公司产品；台式高速离心机为德国 Eppendorf 公司产品；水平板电泳槽为北京六

*　基金项目：国家自然科学基金资助项目（81201249）。　△　通讯作者，E-mail：zhangsm@nifdc.org.cn。

一仪器厂产品；凝胶成像系统为美国 GE 公司产品；ABI3730XL 测序仪为美国 ABI 公司产品。鲍姜(B-G)培养基、蛋白胨水由中国药品生物制品检定所培养基室提供；全基因组 DNA 提取试剂盒为美国 Promega 公司产品；琼脂糖为英国 Oxiod 公司产品；Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 为大连 Takara 公司产品；Glod View™ 核酸染料为北京赛百盛公司产品；HotStar Taq Mastermix 酶体系为德国 Qiagen 公司产品；Betaine 试剂为美国 Sigma 公司产品。

1.3　方法

1.3.1　细菌培养和 DNA 提取　将百日咳杆菌菌株接种于 B-G 培养基，37 ℃培养 72 h 后进行第二代传代培养，再放置培养箱培养，36 h 后用于细菌全基因组 DNA 提取(按试剂操作说明书进行)。

1.3.2　百日咳杆菌的等位基因序列分析　参照文献[5]，以 GenBank 数据库中百日咳杆菌 Prn(GenBank 编号 J04560)、tcfA(GenBank 编号 U16754) 和 ptxP(GenBank 编号 M14378)的基因序列为参考，采用 Primer Premier 5.0 软件设计相应引物，具体基因引物序列和核苷酸位置见表 1；引物由大连 Takara 公司合成。

按照下述 PCR 反应体系及条件进行每种目的基因的 PCR 扩增。ptxP 基因(574 bp)、Prn (869 bp) 和 tcfA (846 bp) 片段的 PCR 反应体系包括：1×PCR 缓冲液、0.2 mmol/L dNTPs 混合物、0.2 mol/L 引物(每条)、2.5 U EX TaqDNA 聚合酶、2 μL DNA 模板，用去离子水补至 50 μL；反应条件：94 ℃ 3 min 预变性，94 ℃ 1 min、60 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min，30 个循环，72 ℃延伸 10 min。Prn (1 483 bp) 和 tcfA (1 371 bp) 片段 PCR 反应体系包括：1×GC PCR 缓冲液、0.4 mmol/L dNTPs 混合物、0.2 mmol/L 引物(每条)、2.5 U LA TaqDNA 聚合酶、2 μL DNA 模板，用去离子水补至 50 μL；反应条件：94 ℃ 3 min 预变性，94 ℃ 1 min、61 ℃ 1 min、72 ℃ 2 min，30 个循环，72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖电泳检测，将每种靶基因特异性扩增片段与预期的目的基因片段大小相一致的送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

1.3.3　百日咳杆菌的 MLVA 分析　本研究选择文献报道的 6 个 VNTR 位点进行菌株基因组的多态性分析[6-7]，扩增片段 VNTR1～6 的大小分别为 383、161、135、234、143、234 bp，位点详细信息及扩增引物序列见表 2。引物合成和荧光基团标记由上海 Invitrogen 公司完成。用上述各对 VNTR 扩增引物对百日咳杆菌 DNA 进行 PCR 扩增，每个 VNFR 位点的 PCR 反应体系见表 3。反应条件为：95 ℃ 15 min 预变性，95 ℃ 20 s、67 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min，25 个循环，68 ℃延伸 30 min。为保证扩增的准确性，每次 PCR 反应设定以无菌去离子水为阴性对照。将上述扩增成功的 PCR 产物 1 μL 加入 ABI3730XL 测序仪专用的 96 孔板内，进行 PCR 产物大小分析，最后用仪器自带 Genescan 软件计算产物的相对分子量。与已测序百日咳杆菌 Tohama Ⅰ 菌株对比，计算出每个菌株在每个位点的 VNTR 重复数。将 VNTR 重复数结果导入 BioNumerics 4.0 软件，选择分类数据类型，使用 Neighbor-Joining 方法进行聚类分析，构建最小扩展树。

1.4　统计学处理　按照文献[7]所描述的方法进行 Simpson′s 多态性指数。应用日本 Statistics 软件中 Fisher 精确检验方法分析多态性指数的差异，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1　用于基因扩增和测序的引物序列

引物名称	核苷酸位置	引物序列(5′→3′)
Prn-1F	151～172	ATG TCT CTG TCA CGC ATT GTC A
Prn-1R	1 653～1 632	GTC CTG CAT GAC GAC CAG CTT G
Prn-2F	1 479～1 498	CTC GAA CGT CGG TGC GCT AC
Prn-2R	2 347～2 328	TCG CGT CCA GGT AGA AAC CG
ptxP-F	60～79	AAT CGT CCT GCT CAA CCG CC
ptxP-R	633～614	GGT ATA CGG TGG CGG GAG GA
tcfA-1F	251～270	CCA CAT TGA TTC AGG CCG CT
tcfA-1R	1 096～1 077	CGT CCG CAG GAG ACT TGG AA
tcfA-2F	976～995	GAC TCC GGT ATG TCC GAT TC
tcfA-2R	2 346～2 327	CTA CCA GGC GTA GCG ATA GC

表 2　VNTR 引物序列(均以百日咳杆菌 Tohama Ⅰ 菌株为参考)

引物名称	核苷酸位置	标记荧光基团及引物序列(5′→3′)
VNTR1-F	2 194 507～2 194 531	HEX-CCT GGC GGC GGG AGA CGT GGT GGT G
VNTR1-R	2 194 862～2 194 889	AAA ATT GCG GCA TGT GGG CTG ACT CTG A
VNTR2-F	2 647 550～2 647 572	HEX-CGC GCC GCC TAC GAC CGC TAT GG
VNTR2-R	2 647 412～2 647 439	CCC GCG CCG AAG ATC TCG CCA AAG ATA T
VNTR3-F	2 591 464～2 591 484	FAM-GCC TCG GCG AAA TTG CTG AAC
VNTR3-R	2 591 350～2591373	GCG GGC GAG GAA ACG CCC GAG ACC
VNTR4-F	185 211～185 231	TAMRA-CGT GCC CTG CGC CTG GAC CTG
VNTR4-R	185 000～185 023	GCC GCT GCT CGA CGC CAG GGA CAA
VNTR5-F	1 005 290～1 005 319	TAMRA-GAA GCC GGC CCA CCC GAG CTC CAG GCT CTT
VNTR5-R	1 005 177～1 005 206	TGC CGG GTT TCG GCA TCT CGA TGG GAT ACG
VNTR6-F	2 099 525～2 099 548	FAM-CCA ACG GCG GTC TGC TGG GTG GTC
VNTR6-R	2 099 315～2 099 336	CGC CGC CCG CTG CGC CGC TAC C

表 3　VNTR 的 PCR 反应体系

成分	VNTR1～5(μL)	VNTR6(μL)
DNA 模板	2	2
引物 1(10 μmol/L)	1	1
引物 2(10 μmol/L)	1	1
Betaine(5 mol/L)	4	6
去离子水	2	0
Taq Mastermix 酶体系	10	10
合计	20	20

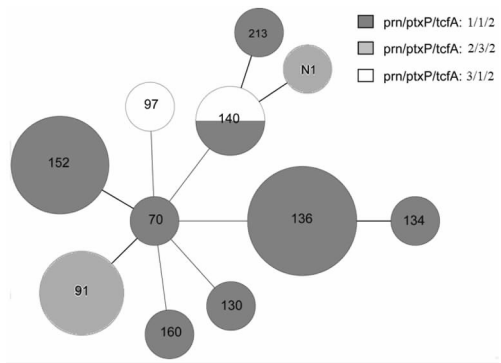

图 1　百日咳杆菌不同 MLVA 型的最小扩展树分析图

2　结　　果

2.1　百日咳杆菌的等位基因序列分析　在百日咳杆菌的 Prn 基因中，从第 266 位氨基酸开始连续形成多个 GGxxP 结构的氨基酸序列(G：甘氨酸；P：脯氨酸；x：任意氨基酸)。根据 Prn 基因此区域形成 GGxxP 结构数量不同以及特定位置(例如 102、260、337、532 及 853 位)氨基酸的不同将 Prn 基因分为 Prn1～12 亚型[5,8]。本研究完成了 21 株分离菌株的 Prn 全基因序列测定，运用 DNAStar 软件分析比较，在这些菌株中共发现 3 种 Prn 基因亚型，即 Prn1、Prn2 和 Prn3，以 Prn1 基因型为主，2000 年分离菌株中才出现 Prn2 或 Prn3 型菌株。研究人员发现百日咳杆菌 ptxP 区域呈现一定多态性，根据特定位置突变碱基不同将百日咳杆菌 ptxP 分成 11 个亚型[8-9]。本研究显示所分离菌株绝大多数仍为 ptxP1 亚型，占 80.95%(17/21)，而其余均为 ptxP3 亚型。tcfA 基因测序结果显示，所分离菌株均为 tcfA2 亚型。根据上述 3 个基因序列分析结果，21 株菌株共有 3 种等位基因组合型：Prn1/ptxP1/tcfA2、Prn2/ptxP3/tcfA2 和 Prn3/ptxP1/tcfA2，所占比例分别为71.43%(15/21)、19.05%(4/21)和 9.52%(2/21)。

2.2　百日咳杆菌的 MLVA 分析　本研究参考 MLVA 数据库收录的各种 MLVA 型的 VNTR 信息，将 21 株分离菌株分成了 12 个不同的 MLVA 型，其中有 1 种 MLVA 型未能在数据库中检索到，将其命名为 N1 型。在 21 株分离菌株中，MLVA-136 型和 152 型为主，所占比例分别为 28.57%(6/21)和 19.05%(4/21)。基于各种菌株 VNTR 位点的重复单位数，进行最小扩展树的绘制，同时为了更加清楚反映不同时期的菌株 MLVA 型的分布，以不同时期的菌株 VNTR 位点为基础绘制了最小扩展树。分离于 2002 年的 BP190 菌株为 MLVA-70 型，尽管该型菌株只发现 1 株，在最小扩展树分析结果显示分离于 1997～2007 年的菌株以 MLVA-70 为中心，形成一个聚类分布，见图 1。

2.3　MLVA 和等位基因分型方法的比较　在近期分离菌株中发现主要 MLVA-136 型和 152 型均为 Prn1/ptxP1/tcfA2 型，而分离于 2000 年以后的 3 株 MLVA-91 型菌株均为 Prn2/ptxP3/tcfA2 型，见图 1。MLVA 分型方法将 21 株百日咳杆菌菌株分成 12 种 MLVA 型(多态性指数为 0.862)，而等位基因分型方法仅为 3 种(多态性指数为 0.467)，2 种方法的多态性指数差异有统计学意义($P<0.01$)，证实了 MLVA 方法在百日咳杆菌基因多态性分析方面具有更高的分辨率。

3　讨　　论

本研究以百日咳杆菌中 2 种重要的细菌表面蛋白基因 Prn 和 tcfA 以及 ptxP 为分子标记，分析了 21 株百日咳菌株基因组多态性。这些菌株的基因型以 Prn1/ptxP1/tcfA2 型为主，含 Prn2 或 Prn3 的菌株较少。在其他实施百日咳疫苗接种历史较长和接种覆盖率较高的国家，含 Prn1 基因亚型的菌株多为疫苗株或分离于未免疫接种时期及免疫接种初期，到了 20 世纪 80 年代末，逐渐被基因组中含 Prn2 的菌株所代替[3-5]。在中国大陆地区，2000 年后才发现基因组中含 Prn2 的菌株，且出现频率较低。这可能与中国大陆地区早期百日咳疫苗免疫接种覆盖率较低或不同地区间疫苗免疫接种覆盖率不平衡有关，这些因素可能对 Prn 基因的分子进化产生一定影响。

研究结果表明，所分析菌株中有 4 株为 ptxP3 型，且这 4 株其他 2 个基因亚型均为 Prn2 和 tcfA2。根据笔者以前与芬兰百日咳参考实验室协作进行的 PFGE 实验结果[10]，这 4 株菌株 PFGE 型均为 BPSR11，为目前欧洲百日咳杆菌流行菌株的 PFGE 型[3]。这些结果提示尽管在中国目前流行菌株的主要基因型(Prn1/ptxP1/tcfA2)与欧洲的 PFGE 型不同，但在中国仍存在一定数量的欧洲目前主要流行菌株。Mooi 等[9]研究表明含有 ptxP3 的细菌通过适应性进化，感染性较强，具有较大的传播性。在中国未来是否该类型细菌能够替代现有的流行菌株，应密切进行监控。

本研究通过 MLVA 法得到的百日咳杆菌基因多态性的分布表明，中国的百日咳杆菌分子流行趋势与其他欧洲一些国家明显不同[6-7,11]。在欧洲国家目前主要流行菌株的 MLVA 型为 MLVA-27 和 29 型，而在本研究收集的菌株中并没有发现这些 MLVA 型菌株，仅发现一些在部分国家流行的 MLVA 型，例如在英国和澳大利亚的主要流行菌株为 MLVA-70 型。同时本研究显示尽管菌株的 MLVA 型不同，但其毒力和抗原等位基因型(例如 Prn、ptxP 和 tcfA)相同，表明 VNTR 基因位点进化快于表面蛋白和膜蛋白基因等毒力和抗原基因，这也说明 VNTR 位点适合用于细菌基因组多态性分析，尤其是较短时间的病原体基因组的改变。此外，MLVA 分型法与等位基因分型法检测菌株多态性相比较差异具有统计学意义，进一步证实 VNTR 位点用于百日咳杆菌菌株分析的实用性。

总之，尽管在中国未出现扩张性克隆的流行菌株，但在本研究收集的 2000 年以后分离的菌株中也发现了目前英国和澳大利亚的主要流行菌株 MLVA-70 型，以及有较强感染性的含

有 ptxP3 基因亚型的 MLVA-91 型菌株，这些菌株应当是以后分子流行病学监控的重点。同时，应收集更多来自不同地区的百日咳杆菌菌株，尤其是 2007 年以后的分离菌株，用于分子流行病学研究，再结合血清学、流行病学研究资料，从而更加全面地了解和认识国内百日咳杆菌流行现状和趋势，从而对有效预防和控制百日咳杆菌的流行以及制定新的百日咳疫苗免疫策略奠定基础。

参考文献

[1] 张秀梅. 天津市宝坻区某小学 1 起百日咳聚集性发病的流行病学调查[J]. 职业与健康，2012，28(7)：875-876.

[2] 李薇，黄海涛，刘勇，等. 一起院内医务人员百日咳聚集性发病的流行病学调查[J]. 中国生物制品学杂志，2012，25(8)：1021-1022.

[3] Elomaa A, Advani A, Donnelly D, et al. Strain variation among Bordetella pertussis isolates in Finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 3681-3687.

[4] Elomaa A, Advani A, Donnelly D, et al. Population dynamics of Bordetella pertussis in Finland and Sweden, neighbouring countries with different vaccination histories[J]. Vaccine, 2007, 25(5): 918-926.

[5] Packard ER, Parton R, Coote JG, et al. Sequence variation and conservation in virulence-related genes of Bordetella pertussis isolates from the UK[J]. J Med Microbiol, 2004, 53(5): 355-365.

[6] Kurniawan J, Maharjan RP, Chan WF, et al. Bordetella pertussis clones identified by multilocus variable-number tandem-repeat analysis[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(2): 297-300.

[7] Litt DJ, Neal SE, Fry NK. Changes in genetic diversity of the Bordetella pertussis population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 680-688.

[8] Kallonen T, He Q. Bordetella pertussis strain variation and evolution postvaccination[J]. Expert Rev Vaccines, 2009, 8(7): 863-875.

[9] Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, et al. Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence[J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(8): 1206-1213.

[10] Zhang L, Xu Y, Zhao J, et al. Effect of vaccination on Bordetella pertussis strains, China[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(11): 1695-1701.

[11] Advani A, Van der Heide HG, Hallander HO, et al. Analysis of Swedish Bordetella pertussis isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage[J]. J Microbiol Methods, 2009, 78(3): 297-301.

（收稿日期：2012-09-29）

（上接第 2690 页）

Arg3.1[J]. J Biol Chem, 2010, 285(28): 21615-21624.

[6] Anusaksathien O, Webb SA, Jin QM, et al. Platelet-derived growth factor gene delivery stimulates ex vivo gingival repair [J]. Tissue Eng, 2003, 9(4): 745-756.

[7] Badache A, De Vries GH. Neurofibrosarcoma-derived Schwann cells overexpress platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and are induced to proliferate by PDGF BB[J]. J Cell Physiol, 1998, 177(2): 334-342.

[8] Aoki M, Nabeshima K, Koga K, et al. Imatinib mesylate inhibits cell invasion of malignant peripheral nerve sheath tumor induced by platelet-derived growth factor-BB[J]. Lab Invest, 2007, 87(8): 767-779.

[9] Lobsiger CS, Schweitzer B, Taylor V, et al. Platelet-derived growth factor-BB supports the survival of cultured rat Schwann cell precursors in synergy with neurotrophin-3[J]. Glia, 2000, 30(3): 290-300.

[10] Lange S, Heger J, Euler G, et al. Platelet-derived growth factor BB stimulates vasculogenesis of embryonic stem cell-derived endothelial cells by calcium-mediated generation of reactive oxygen species[J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(1): 159-168.

[11] Salmeen A, Park BO, Meyer T. The NADPH oxidases NOX4 and DUOX2 regulate cell cycle entry via a p53-dependent pathway [J]. Oncogene, 2010, 29(31): 4473-4484.

[12] Adachi T, Togashi H, Suzuki A, et al. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells [J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1272-1281.

（收稿日期：2012-05-09）

统计资料类型

统计资料共有三种类型：计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料，指通过度量衡的方法，测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小，得到的一系列数据资料，其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到，如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位（受试对象）按某种性质或特征分组，然后分别清点各组观察单位（受试对象）的个数，其特点是没有度量衡单位，多为间断性资料，如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组，男性组有 72 例，女性组有 70 例，即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料，可通过半定量的方法测量，其特点是每一个观察单位（受试对象）没有确切值，各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同，如根据某种药物的治疗效果，将患者分为治愈、好转、无效或死亡。