

耐异烟肼结核分枝杆菌 *katG* 基因突变快速筛选的研究

霍亚楠¹, 葛超荣²

(1. 浙江大学医学院临床医学一系, 浙江 杭州 310031; 2. 浙江大学医学院附属第一医院, 浙江 杭州 310003)

[摘要] 目的: 建立结核分枝杆菌(MTB)*katG* 基因点突变的筛选方法, 了解结核分枝杆菌耐异烟肼(INH)的状况。方法: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)技术, 对 8 株耐 INH 的临床 MTB 分离株、16 株对 INH 敏感的临床分离株及 MTB 标准株 H₃₇Rv 的 *katG* 基因, 进行聚合酶链(PCR)反应扩增 *katG* 基因片段, 再用 *Msp* I 内切酶分别对 PCR 产物进行消化反应。如果有 315 位点 AGC 突变为 ACC, 则将增加一个切点。结果: 检测到 8 株耐药株中有 7 株增加了一个 *Msp* I 内切酶切点, 耐药株中 *katG* 基因点突变检出率为 87.5%(7/8); 16 株敏感株和标准株均无额外的 *Msp* I 内切酶切点。未发现 *katG* 基因序列的缺失。结论: *katG* 基因点突变是 MTB 耐 INH 的重要机理之一; 用 PCR-RFLP 检测耐 INH 的 MTB 的 *katG* 基因点突变具有快速、简便、敏感性高、特异性强的特点。

[关键词] 结核杆菌; 异烟肼; 抗药性; 微生物; 基因; 限制性片段长短的多态现象; 聚合酶链反应

[中图分类号] R 978.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2002)03-0178-03

Rapid screening of *katG* gene mutation in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

HUO Ya-nan, GE Chao-rong (College of Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the relationship between *katG* gene mutation and isoniazid (INH) resistance and to develop a rapid screening method of point mutation in the *katG* gene associated with MTB resistance. **Methods:** Twenty-four clinical isolates of MTB with 8 INH resistance isolates and 16 INH-sensitive isolates were analyzed by PCR-RFLP, with the H₃₇Rv reference strain as the control. **Results:** G→C point mutations were detected in 7 of 8 isoniazid-resistant strains and no gene mutation was shown in 16 isoniazid-sensitive isolates. The sensitivity and specificity were 87.5% and 100% respectively. No *katG* gene sequence deletion was observed in any specimen. **Conclusion:** Our results suggest *katG* gene mutation is one of the most important mechanisms of INH-resistant TB. PCR-RFLP may be useful in detection of *katG* gene mutation.

[Key words] *Mycobacterium tuberculosis*; Isoniazid; Drug resistance, microbial; Genes; Restriction fragment length polymorphisms; Polymerase chain reaction

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2002, 31(3):178-180.]

结核病是严重危害人类健康的全球性传染病。异烟肼(INH)是当今主要抗结核药物之一。如感染菌为 INH 耐药株, 化疗的成功率将受到影响。目前结核分枝杆菌(MTB)耐药性测定多采用改良罗氏培养基绝对浓度法、比例法等。由于 MTB 生长缓慢, 特别是耐药菌, 耐药性测定需 6~8 周, 甚至更长时间, 因而几乎不能为有效药物的选择提供信息。建立于 20 世纪 80 年代的 BACTEC MTB 快速培养系统和近年来利用 MTB 信号噬菌体技术进行 MTB 耐药性

检测法, 需昂贵仪器设备, 其结果与经典法也往往不尽一致, 与临床疗效也不完全平行, 尤其是后者进行一次测定需 10⁶~10⁸ 个活菌, 故只能适用于检测培养菌株。有关研究表明, MTB 耐 INH 的最主要机理是 *katG* 基因的点突变, 尤其是密码子 315(AGC)的丝氨酸突变为苏氨酸(ACC)的意义更被肯定。本研究在此基础上建

收稿日期: 2001-04-29 修回日期: 2001-12-04

作者简介: 霍亚楠(1981-), 女, 医学系 99 级学生。

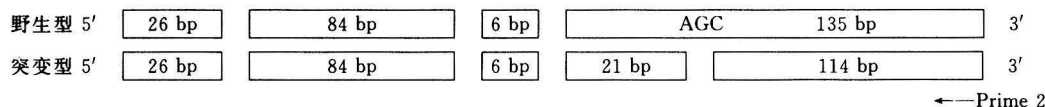
立 PCR-RFLP 作为快速筛选 MTB 耐 INH 的方法,并用该方法来检测 MTB,以了解临床 MTB 耐 INH 的情况。

1 材料和方法

1.1 菌种及标本来源 标准株购于中国药品生物制品检定所;24 株 INH 耐药及敏感的临床 MTB 菌株由杭州市结核病防治门诊部提供。根据《结核病诊断细菌学检测规程》有关要求作菌型鉴定,以改良罗氏培养基绝对浓度的间接法作药物敏感试验。INH 耐药标准:1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 分别是低度耐药和高度耐药。

1.2 主要试剂 溶菌酶、PCR 引物、*Taq* DNA 聚合酶和 dNTP 购自 Promega 公司;限制性内

Prime 1 $\longrightarrow$



如果没有 AGC 突变为 ACC 则该片段分别被酶切成 26 bp、84 bp、6 bp、135 bp 4 个条带。如果有突变,则被酶切为 26 bp、84 bp、6 bp、21 bp 和 114 bp 5 个条带。

1.5 DNA 提取 参照《现代分子生物学研究技术》(华美生物工程公司出版),采用质粒 DNA 少量快速提取法提取 DNA。

1.6 PCR 反应体系及程序 反应体系 50 μl 。含 H_2O 28.6 μl ,10 $\times$ PCR buffer 5 μl ,2 mmol MgCl_2 4 μl ,dNTP 5 μl ,引物 1 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 1 μl ,引物 2 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 1 μl ,*Taq* DNA 聚合酶(5 g/L)0.4 μl ,模板 5 μl 。混匀后 94 $^\circ\text{C}$ 3 min,然后进行 PCR 反应:94 $^\circ\text{C}$ 变性 1 min,64 $^\circ\text{C}$ 退火 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min,共进行 35 个循环,最后一个循环 72 $^\circ\text{C}$ 5 min,4 $^\circ\text{C}$ 保存待测。

1.7 PCR 反应产物的检测 扩增结束后,取扩增产物 8 μl ,加入 10 μl 0.5 $\times$ TBE 和 3 μl 加样缓冲液,点样于 2%琼脂糖凝胶样品孔内,50 V 电泳 45 min,紫外灯下检测,经分子量标准对照,有 250 bp 扩增带即为阳性。

1.8 RFLP *katG* PCR 产物在 20 μl 反应体系中进行酶切反应:DNA 10 μl ;10 $\times$ 酶切缓冲液 2 μl ;2 单位限制性内切酶 *Msp* I;加 dd H_2O 到 20 μl 。轻微震荡,离心,37 $^\circ\text{C}$ 反应 1 h。电泳:

切酶 *Msp* I 购自 New England Biolabs 公司;琼脂糖购自上海生物工程公司。

1.3 主要仪器 PCR 仪:PERKIN ELMER PE9600;电泳仪 LIFE TECHNOLOGIES GIBCO BRL HORTZOH(美国);高速冷冻离心机:Heraeus Instruments Labofuge 400R(德国);紫外分光光度仪:Pharmacia Bioth Ultrospec 2000;紫外成像仪:Kaiser RSI Alpha Innotech Corporation。

1.4 PCR 引物设计 从 Gene Bank 获得 *katG* 基因序列,设计一对引物以扩增含 315 突变位点的 *katG* 片段。Prime 1: 5' CACTTTCGGT AAGACCCATGGC 3';Prime 2: 5' TATTGC CAAGCGCCAGCAGG 3'。

取 5 μl 反应液进行 2%琼脂糖电泳,EB 染色后,观察酶切片段。

2 结果

2.1 药敏试验 24 株临床分离株中,有 8 株为低度耐药(33%),16 株为敏感株(67%)。

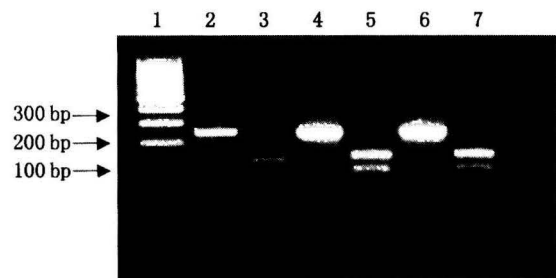
2.2 *katG* PCR 扩增结果 24 株临床分离株均扩增到 *katG* 基因片段,提示未发现完全缺失的 *katG* 的基因。

2.3 RFLP 分析结果 *katG* 基因发生 G $\rightarrow$ C 点突变后可被内切酶 *Msp* I 识别并消化,可观察到 114 bp 的 DNA 片段。野生型 *katG* 基因在此位点不能被内切酶消化,可观察到 135 bp 的 DNA 片段。对 8 株 INH 耐药株作 RFLP 分析均未有 *katG* 片段缺失,7 例被 *Msp* I 内切酶消化后生成 114 bp 片段,16 株敏感株和标准株能生成 135 bp 片段,检出特异性为 100%。突变检出率为 87.5%,见图 1。

3 讨论

MTB 对 INH 耐药情况一直备受关注。目前急需解决的问题,是如何创建一种对临床分离菌株耐药性进行快速检测的有效方法。近年来随着分子生物学技术的发展和 MTB 研究的逐步

深入,使利用分子生物学手段,建立非生长依赖性快速检测 MTB 耐药性方法已成为可能。



1: Marker; 2: PCR product from INH resisted isolates; 3: Resisted isolates, digested by *Msp I*; 4: PCR product from INH susceptible isolates; 5: Susceptible isolates, digested by *Msp I*; 6: PCR product from H₃₇Rv reference strain; 7: H₃₇Rv reference strain, digested by *Msp I*

图 1 RFLP 检测结果

Fig. 1 RFLP detection

1992 年报道首例 *katG* 基因缺失的 MTB 对 INH 高度耐药以来,不断有新的与异烟肼耐药相关的基因缺失、移位、以及突变位点被发现,但在这些耐药菌株中,很少发现有 *katG* 基因的完全缺失^[1]。我国目前对 *katG* 基因的分析多集中于 282 bp 与 237 bp 的突变区域,这些区域的变异可在 2/3 的耐药菌株中观察到^[2]。但对于引起耐药的原因是否确系在于该区域的突变,以及在耐药菌株中存在联合突变位点时,该如何判断引起耐药的根本原因的问题,就 INH 耐药机理而言,尚未得出确切结论。

近年来,国外学者开始从基因水平对 MTB INH 耐药性研究。大量的研究认为,INH 实际上是一个药物前体,需经 MTB 过氧化氢-过氧化物酶(*katG*)活化后才发挥抗结核作用,而过氧化氢-过氧化物酶正是由 *katG* 基因所编码的^[3]。1992 年 Zhang 等^[4]在对耐 INH 的临床分离株中,发现最低抑菌浓度 $>50 \mu\text{g/ml}$ 的 3 株菌株中有 2 株存在 *katG* 基因片段的缺失。他们认为:*katG* 基因的缺失是 MTB INH 耐药性的共同机理。可是 Zhang 和 Young 等进一步研究却发现,INH 耐药菌中 *katG* 基因的完全缺失仅占 20%。Morris 等用 PCR-SSCP 方法,在 42 株 INH 耐药株中,检测到 20 株 *katG* 基因突变,但没有发现缺失突变形式的存在。Heym 等

用同样的方法,也得到相似结果^[5]。本组 24 株 INH 敏感及耐药株中,均未发现有 *katG* 基因缺失,在 8 株 INH 耐药株中,有 7 株检测到 *katG* 基因 AGC→ACC 点突变,提示 MTB 耐 INH 可能存在其他的基因变异。再者,临床分离株 *katG* 基因点突变率高,在临床进行抗结核治疗时应及时进行耐药性监测。

本实验所采用的 PCR-RFLP 方法,是通过 PCR 扩增含有特定酶切位点的 DNA 片段,该片段经限制性内切酶消化后电泳可显示两条较小的片段;在野生型无此酶切位点,PCR 产物经酶消化后电泳只能显示一条较大的 PCR 扩增片段。该方法的优点是对细菌染色体提取质量要求不高,简便、易行且具有较高的特异性,但只能用于分析已知序列特定位点的基因突变。与 PCR-SSCP 分析相比,前者检测的灵敏度高,且特异性不受影响,可直接用于分析临床标本部分 MTB SM 耐药基因型,可分辨 DNA 链中单碱基的变异。

References:

- [1] WU Xue-qiong, ZHONG Min, ZHANG Jun-xian, et al (吴雪琼,钟敏,张俊仙,等). Nucleotide sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis katG* gene mutation by using direct PCR [J]. Journal of Clinical Examination (临床检验杂志), 2000, 18(1): 9-11. (in Chinese)
- [2] WU Xue-qiong, ZHUANG Yu-hui, ZHANG Xiao-gang, et al (吴雪琼,庄玉辉,张晓刚,等). Study on molecular mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chinese Journal of Tuberculosis Protection (中国防痨杂志), 1998, 20(1): 35-39. (in Chinese)
- [3] CAI Mei-ying (蔡美英). Mutation of hydrogen hyperoxide -hyperoxide gene encoded by isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains [J]. Branch of Microbiology, Foreign Medical Science [国外医学(微生物学分册)], 1995, 18(1): 47-48. (in Chinese)
- [4] Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Nature, 1992, 358 N. 6387: 591-595.
- [5] ZHANG Zong-de, MA Yu, CHENG Shao-ji, et al. (张宗德,马玉与,程绍基,等). Study on the relationship between isoniazid-resistance and KatG gene mutation of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases (中华结核和呼吸杂志), 1996, 19(6): 346-351. (in Chinese)