

上海医科大学

---

博士学位论文

---

结核分支杆菌katG基因突变与其耐异烟肼机制的系列研究

---

姓名：张文宏

---

申请学位级别：博士

---

专业：传染病学

---

指导教师：邬祥惠;李忠明

---

2000. 11. 1

## 中文摘要

异烟肼 (INH) 作为抗结核治疗的首选药物, 对结核病的有效控制发挥了重要作用。但近年来结核分支杆菌对 INH 耐药性以及多重耐药的出现已成为抗结核治疗中的重大障碍。研究结核杆菌对 INH 的耐药机制并创建一种对临床分离菌进行快速检测的有效手段, 是目前迫切需解决的问题。katG 基因的变异 (包括点突变、缺失、插入等) 可以解释 90% 以上的 INH 耐药。因此研究异烟肼耐药机制离不开对 katG 基因的检测与分析。在目前异烟肼耐药机制研究中遇到的问题有二, 一是如何有效、低成本筛选异烟肼耐药基因, 二是如何对筛选出的突变体进行评估。特别是后者, 目前是公认的难点, 这也是临床应用分子生物学技术检测耐药菌株的限制因素。

本课题在国内首次利用基因重组技术克隆成功结核杆菌 katG 基因, 实现了重组 katG 蛋白的高效表达与纯化, 并在此基础上建立了检测 katG 蛋白功能的方法, 为从基因功能上研究耐药机制打下基础。

在成功 katG 基因克隆并完成 katG 基因的表达及其表达产物的纯化后, 本研究在国内首次应用定点诱变技术获得临床中最为常见的 katG 突变体 (S315T 与 R463LkatG), 比较突变体蛋白与野生型蛋白功能的差异, 以此评价临床耐药菌常见突变位点的意义。在国内首次从机制上对突变体的意义进行了评估, 而不是仅仅停留在分子流行病学的分析上, 为进一步以分子生物学技术检测临床异烟肼耐药奠定基础。

最后, 本研究从 PCR-SSCP 技术着手, 对临床耐异烟肼菌株进行了筛检, 此后结合电转化技术将野生型 katG 基因与突变体基因转化进入高度耐异烟肼、katG 基因缺陷的耻垢分支杆菌 (*M. Smegmatis*), 比较转化后 *M. Smegmatis* 对异烟肼药敏的变化, 从而判断突变体在耐药机制中的意义。最后, 提出了在以上研究的基础上如何制定筛选临床耐药菌株以及评估耐药相关性突变体的策略。

## 第一部分、结核分支杆菌 KatG 基因的克隆及功能的初步分析

本研究用 PCR 方法克隆 katG 基因并将其构建在表达载体 pET24b 上, 利用大肠杆菌偏爱的 T7 噬菌体启动子, 在 IPTG 诱导下高效表达 katG 蛋白。所表达的蛋白为 N 末端携带 6 个组氨酸的融合蛋白, 有利于进一步采用镍亲和柱一步纯化来获得高纯度的表达产物。通过基因重组获得的 KatG 表达载体转化到大肠杆菌后高效表达了 katG 蛋白, 相对分子质量约为  $80 \times 10^3$ , 表达量可占总菌体蛋白的 17.7%。表明该基因重组的菌株为 katG 的高表达菌株, 进一步对表达产物进行纯化后可提取到纯度超过 90% 的 katG 蛋白。对表达产物进行初步过氧化氢酶活性研究验证了其酶活性。本研究为进一步研究 katG 蛋白奠定了基础。

## 二、定向诱变法克隆 katG 基因突变体以及对其功能的比较分析

本部分的研究成功地以定点诱变的技术克隆了 katG 基因的两个常见突变体 (R463L 与 S315T), 并以直接测序对诱变结果作了初步验证。应用本文第一部分建立的方法, 对突变体的 katG 进行克隆与表达, 检测突变体 katG 蛋白与野生型蛋白在功能上的区别, 从而直接对该两个突变点在耐药机制中的意义作出论证, 希望能为今后以分子生物学方法检测耐药株作出一些基础性的铺垫。通过对突变体的过氧化氢酶的活性检测发现, S315T 位的突变导致过氧化氢酶活性较野生株显著下降 (约降低 50% 左右), 提示该密码子突变与 katG 功能改变造成过氧化氢酶活性降低密切相关。R463L 突变体的情况有所不同, 该位点的突变并未带来 katG 的过氧化氢酶活性降低。结合目前临床菌株中不断发现有该位点的突变, 可以得出初步结论, 即将 463 密码子突变作为检测耐药的依据尚不充足。

## 三、katG 突变体的检测与评价

本部分研究从对 INH 耐药最为重要的 katG 基因着手, 建立最有效、低成本的突变点初筛方法——PCR-SSCP (single Strand Conformation Polymorphism, 多聚酶链反应-单链构象多态) 分析法, 进而结合本研究的第一与第二部分工作 (即 KatG 基因的克隆技术、定点诱变技术) 以及 KatG 基因转导提出评价突变点意义的策略。

PCR-SSCP 是一种 DNA 单链凝胶电泳技术, 它根据形成不同构象的等长 DNA 单链中中性聚丙烯酰胺凝胶中的电泳迁徙率变化来检测基因变异, 该法具有快速、简便、灵敏和适于大样本筛查的特点, 可有效检出碱基置换、缺失、插入等基因, 本研究以 katG 包含 315

位点的约 260bp 的片段为例, 建立 katG 基因点突变的初筛方法. 本研究进一步通过电转化转导技术将野生型 katG 基因与突变体基因转化进入高度耐异烟肼、katG 基因缺陷的耻垢分支杆菌 (*M. Smegmatis*), 比较转化后 *M. Smegmatis* 对异烟肼药敏的变化. 结果发现通过电转化技术, 使对异烟肼高度耐药、katG 基因缺失的 *M. smegmatis* 分别获得野生型的 katG 基因与 katG 基因的 S315T 突变体, 发现获得前者的菌株恢复了对异烟肼的敏感性, 而后者并未恢复耐药菌对异烟肼的敏感性. 从基因水平证实了 S315T 突变在异烟肼耐药机制中的重要性. 在缺乏电转化技术所需设备时, 则可以结合本研究的第二部分, 通过表达 katG 蛋白, 评估突变体酶活性的改变, 也可得出有意义的结论.

总之, 结核分支杆菌的 INH 耐药性是相当复杂的, 迄今为止的大量研究还不能对此作出完全解释, 尚有许多领域需要进一步探索. 今后的研究, 可能既要着重对这些 INH 耐药基因作进一步的 DNA 序列分析, 以明确其突变位点、突变类型及发生频率, 同时也需对这些突变点的意义作慎重的评估. 对 katG 基因的克隆、表达以及定向诱变技术、PCR-SSCP 技术与电转化技术在研究结核杆菌对异烟肼的耐药机制以及筛选与评估突变体方面具有重要价值.

关键词: 结核杆菌; 异烟肼; 耐药; katG; 克隆; 表达; 纯化; 定向诱变; 聚合酶链反应-单链构象多态分析; 电转化;

## **Study on the KatG Gene Mutations of Mycobacterium tuberculosis and its Relationship to Isoniazid Resistance**

### **ABSTRACT**

Mycobacterium tuberculosis is still the most pathogens around the world. In recent years, the dramatic increase in the number of drug-resistant strains has complicated the management of tuberculosis, with resistance rates as high as 35% being reported both in China and worldwide. Isoniazid is one of the earliest used anti-TB drugs and remains to be an most important ingredient in all treatment regimens. However, the isoniazid-resistant MTB infections become more severe than ever. It has been found that at least three genes have been implicated in resistance to INH – katG, inhA and ahpc, and katG variation almost exist in 90% resistant strains. How to screen the genes associated with INH resistance effectively from clinical strains and furthermore to evaluate the clinical significance of variations (mutation, shift and depletion) to INH resistance are 2 tasks remains to be done before using molecular biological technology to detect INH-resistant strains.

In this study, it was the first time to clone katG gene in China. After katG gene was successfully cloned, expressed, site-directed mutagenesis techniques were utilized to alter the wild-type katG gene from M. tuberculosis at 2 of the most commonly found mutated codons in INH-resistant clinical strains. This is also the first time in China to utilize the site-directed techniques to evaluate the significance of mutated codons beyond investigating the INH-resistance just through molecular epidemiology.

Lastly, PCR-SSCP technique was set up to screen INH-resistant strains with mutated katG gene. Moreover, electroporated transformation technique was used to transform wild-type katG as well as mutated katG gene into M. smegmatis and thereafter the susceptibility of M. smegmatis to INH was studied.

## **Part one, Overexpression and purification of catalase-peroxidase katG from *Mycobacterium tuberculosis***

KatG gene was cloned by PCR technique and plasmid pET24b containing KatG was constructed and transferred into competent *E. coli*. Positive clones were screened using double digestion and PCR. Thereafter, plasmid pET24b containing KatG was transferred into competent *Escherichia coli* and katG gene was overexpressed by the challenge of IPTG. The expression of KatG protein was one-step purified by Xpress system™. The expression of KatG protein was identified by SDS-PAGE. Furthermore, the catalase activity of KatG protein was preliminarily detected. The results showed that the recombinant *Escherichia coli* produced KatG protein in large quantities, corresponding to 17.7% of total cell protein. The molecular mass of KatG protein was estimated to be 80Kda by SDS-PAGE. It was found that imidazole with the concentration of 350mmol/L could elute the katG protein most efficiently and yielded the final preparation at greater than 90% purity. Lastly, the katG protein was detected to have the activity of catalase. In conclusion, the construction, expression and purification of katG in *E. coli* was successful, which can be used to investigate the mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to INH.

## **Part two, Site-directed mutagenesis of the katG gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase activity associated with isoniazid resistance.**

To examine the effect of specific mutations in katG on enzyme activity associated with INH sensitivity, 2 mutagenic oligonucleotides were used to introduce mutations at 463 and 315 codons in the wild-type *M. tuberculosis* katG gene using site-directed mutagenesis techniques. The presence of the desired mutation (eg, S315T) was confirmed by

nucleotide sequence analysis. As mutations at position 463 and 315 have been frequently observed in clinical isolates of *M. tuberculosis* resistant to INH, we generated such two mutations for enzymatic activity to evaluate the significance of the two mutations. Thereafter, the mutated *katG* gene were constructed in pET24b and transformed into *E. Coli*. The *katG* protein was then expressed and the catalase activities of which were detected. It was found that the enzymatic activity of S315T *katG* mutant was reduced 50% but not eliminated. In contrast, the substitution of R463L had no apparent effect on catalase activity. The results suggest that S315T was related with INH resistance and R463L substitution does not significantly affect the enzymatic activity of *katG*.

### **Part three, detection and evaluation of *katG* mutants**

In this part of the study, PCR-SSCP technique was used to screen *katG* mutants in clinical strains. The PCR products of *katG* fragment with 260bp containing codon 315 from 16 strains, 8 of which were resistant to INH, were electrophoresed at 3 to 4w for 1.5h into MDE gel using TBE buffer. The gene fragments of 2 of 8 INH-resistant strains containing mutations in the *katG* were identified using SSCP analysis by comparison with the control *M. tuberculosis* strain, H37Rv. The SSCP profiles of the 2 strains were different from that of the control H37Rv. As 260bp *katG* fragment SSCP analysis could not detect any mutations in the *katG* coding sequence of these isolates, extensive SSCP analysis should be developed when screening clinical INH-resistant isolates. However, the purpose of this part in the study was to set up a screening technique.

The initially cloned S315T pET24b was used to transform the S315T *katG* gene into pMD31, which was the vector to transform *katG* gene into highly INH-resistant catalase-negative *M. smegmatis*. The pMD31 *katG* clone with S315T mutant was electroporated into the *M. smegmatis* and the transformants were selected on middlebrook 7H9 agar containing kanamycin. Subsequently, the transformants were streaked on plates

containing kanamycin and isoniazid. The absence or presence of growth were recorded after 48h of incubation at 37 °C. It showed that *M. smegmatis* expressing *M. tuberculosis* condon 315 mutant *katG* gene did not restore the susceptibility of *M. smegmatis* to INH, whereas, *M. smegmatis* expressing *M. tuberculosis* wild-type *katG* gene could restore the susceptibility. The results implicated the S315T mutant codon is a mutation contributed to clinical resistance of MTB to INH.

In conclusion, PCR-SSCP technique combined direct sequencing, site-directed mutagenesis as well as electroporation technique can be used to screen and evaluate the clinically significant mutants, which can be used to detect INH-resistant MTB infections by molecular biological techniques.

Key words: *M. tuberculosis*; Isoniazid; *katG*; Clone; Expression; Purification; Site-directed mutagenesis; PCR-SSCP; Electroporation



# 结核分支杆菌 katG 基因突变与其耐异烟肼机制的系列研究

复旦大学附属华山医院 97 级博士生 张文宏

## 引言

异烟肼 (INH) 作为抗结核治疗的首选药物, 对结核病的有效控制发挥了重要作用。但近年来结核分支杆菌对 INH 耐药性以及多重耐药的出现已成为抗结核治疗中的重大障碍。研究结核杆菌对 INH 的耐药机制并建立一种对临床分离菌进行快速检测的有效手段, 是目前迫切需解决的问题<sup>[1]</sup>。自 1992 年 Nature 杂志首先刊登过氧化氢酶-过氧化物酶基因 (katG) 与 INH 耐药性关系的文章<sup>[2]</sup>之后, katG 基因的研究至今仍是异烟肼耐药机制中的最大热点。有人认为 katG 基因的变异 (包括点突变、缺失、插入等) 可以解释 90% 以上的 INH 耐药<sup>[3]</sup>。

早年的研究就发现 INH 耐药菌中过氧化物酶的缺乏与 INH 耐药之间有着密切关系<sup>[4]</sup>。直至 1992 年, Zhang 等才克隆出过氧化氢酶的编码基因, 并首次发现 INH 高度耐药菌中有 2/3 完全缺失 katG 基因。大量的研究认为, INH 实际上是一个药物前体, 需经结核分支杆菌过氧化氢酶-过氧化物酶 (katG) 活化后才发挥抗结核作用, 而过氧化氢酶-过氧化物酶正是由 KatG 基因所编码。近年来国内外学者应用多种检测技术对 katG 基因结构进行了更为精确的分析, 结果表明: 引起 INH 耐药性更为主要的原因是 KatG 基因中的点突变、部分缺失或碱基对的插入, 而并非单纯的 katG 基因的完全缺失所造成<sup>[5]</sup>。随着对临床耐 INH 菌株 katG 基因研究的不断深入, 有 2 个突变点尤为引人注目, 即密码子 315 (AGC) 与 463 (CGG) 位的丝氨酸与精氨酸突变, 成为苏氨酸 (ACC) 与亮氨酸 (CTG), 有学者认为此等发现可以解释 70% 的异烟肼耐药事件, 从而一度认为只要检测该两个突变位点就可以基本解决 INH 耐药的快速诊断问题<sup>[6,7]</sup>。但疑点不久随之产生, 主要是集中在 463 密码子上, 因

为在敏感菌株中发现了一定比例的 463 密码子突变（虽然在比例上仍低于耐药菌株）<sup>[8]</sup>。因此有必要对结核杆菌 *katG* 进行核苷酸序列与蛋白质功能的联合研究，明确耐药菌株中出现的点突变是否确系引起耐药的原因，这些突变是否导致了该基因所表达的蛋白特性的改变，从而明确检测这些点突变是否能提示临床耐药的存在。

由于结核分支杆菌生长较缓，而且具有较强的传染性，长期以来直接提取结核分支杆菌蛋白进行耐药性研究的进展缓慢，如果利用基因工程表达系统来获得重组蛋白，无疑能使该领域的研究获得新的进展。本课题拟利用基因重组技术获得结核杆菌 *katG* 基因表达的重组 *katG* 蛋白，并建立检测 *katG* 蛋白功能的方法。

在成功 *katG* 基因克隆并完成 *katG* 基因的表达及其表达产物的纯化后，应用定点诱变技术获得临床中最为常见的 *katG* 突变体（S315T 与 R463L*katG*），比较突变体蛋白与野生型蛋白功能的差异，以此评价临床耐药菌常见突变位点的意义，为进一步以分子生物学技术检测临床异烟肼耐药株奠定基础。

本研究还建立 PCR-SSCP 技术对临床耐异烟肼菌株进行突变体的筛检，并引入电转化技术，将野生型 *katG* 基因与突变体基因转化进入高度耐异烟肼、*katG* 基因缺陷的耻垢分支杆菌 (*M. Smegmatis*)，比较转化后 *M. Smegmatis* 对异烟肼药敏的变化，从而判断突变体在耐药机制中的意义。

由于本课题的三个研究部分既相互联系又各自独立，因此本文将分三个部分分别予以叙述讨论。

## 第一部分

### 结核分支杆菌 KatG 基因的克隆及功能的初步分析

自 1992 年首次在异烟肼高度耐药菌株中发现 katG 基因缺失以来<sup>[2]</sup>, 对于 katG 基因变异或缺失造成分支杆菌对异烟肼耐药的研究已较为深入。研究表明 INH 实际上是一个药物前体, 需经结核分支杆菌过氧化氢酶-过氧化物酶活化后才发挥抗结核作用, 而过氧化氢酶-过氧化物酶则由 KatG 基因所编码<sup>[4]</sup>。但为何其他细菌如大肠杆菌等虽也产生 katG, 而异烟肼唯独对结核分支杆菌野生株有效, 以及过氧化氢酶-过氧化物酶如何活化异烟肼、发生变异后的酶是结构上抑或是功能上的改变而导致耐药的确切机制仍然不清, 特别是近年来对于不同突变位点的变异对药物敏感性的影响颇有争议<sup>[8]</sup>, 那么不同突变体的表达产物在功能上有何差异呢? 这些均需要对 katG 基因表达的产物进行研究。由于结核分支杆菌生长较缓, 而且具有较强的传染性, 长期以来在提取结核分支杆菌蛋白质进行研究的进展较缓, 因此有必要利用表达系统来获得重组蛋白以供研究, 从而有可能将基因变异与异烟肼耐药相关的蛋白功能相结合进行更为深入的研究。

本研究用 PCR 方法克隆 katG 基因并将其构建在表达载体 pET24b 上, 将含有 katG 基因的 pET24b-katG 表达载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株, 以 IPTG 诱导实现 KatG 基因的高表达, 为进一步研究 katG 基因与结核杆菌对 INH 的耐药机制奠定基础。

## 材料与方法

### 1 材料和试剂

#### 1.1 菌株与质粒

- 结核分支杆菌野生型 H37Rv 标准株: 由本校客座教授、美国 FDA 分支杆菌实验室李忠明博士提供, 标准菌株号 27294。
- 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ : 基因型 supE44 $\Delta$ lacU169( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15)hsdR17recA1enA1gyrA96thi-1 relA1
- 大肠杆菌 BL21 (DE3): 基因型 F-,ompT,hsdS<sub>B</sub>,(*r*<sub>B</sub><sup>-</sup>,*m*<sub>B</sub><sup>-</sup>),dcm,gal, $\lambda$ (DE3)
- 载体质粒 pET24b: 美国 Invitrogene 公司产品

#### 1.2 主要试剂与酶类

- PWO DNA 聚合酶: 罗氏公司产品
- 各种限制性内切酶: 罗氏公司产品
- T4DNA 连接酶(T4 DNA Ligase): 罗氏公司产品
- dNTPs 混合液: Promega 公司产品
- QIAquick PCR purification kit, 德国 QIAGEN 公司产品
- QIAquick Gel extraction kit, 德国 QIAGEN 公司产品
- 细菌 DNA 抽提试剂盒: 德国 QIAGEN 公司产品
- 质粒 DNA 抽提试剂盒: 德国 QIAGEN 公司产品
- 十二烷基硫酸钠: 华舜公司进口分装
- 丙烯酰胺与 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺: SIGMA 公司
- 核酸和蛋白质分子量标准: 购自 Promega 公司
- 异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG): 华美生物工程公司产品
- Tris: 分析纯, 德国 Boehringer Mannheim 公司产品
- 寡聚核苷酸: 由 Sangon 生物工程公司合成
- 测定酶活所用试剂: 国产 AR 级产品。
- Xpress 蛋白纯化试剂盒: 美国 Invitrogen 公司产品
- 卡那霉素, 上海延安制药厂

#### 1.3 常用试剂与培养基的配制

- 50 $\times$ TAE: Tris 碱 242g 加 ddH<sub>2</sub>O 600ml 充分溶解, 加冰乙酸 57.1ml、0.5M EDTA (pH=8) 100ml, 定容至 1 L, 分装灭菌。电泳时稀释为 1 $\times$ TAE

- LB培养基: 蛋白胨 16g、酵母粉 10g、NaCl 5g, 加 800ml ddH<sub>2</sub>O 搅拌至充分溶解, 加 5 M NaOH 调 pH 至 7.0, 定容至 1L, 分装成每瓶 100ml 灭菌
- 1.5mol/L Tris (pH8.8): 称取 Tris 碱 18.16g, 加 50ml ddH<sub>2</sub>O 充分溶解, 加浓盐酸调节 pH 至 8.0, 加水定容至 100ml, 灭菌
- 1.0mol/L Tris (pH6.8): 称取 Tris 碱 12.11g, 加 80ml ddH<sub>2</sub>O 充分溶解, 加浓盐酸调节 pH 至 6.8, 加水定容至 100ml, 灭菌
- 0.5M EDTA (pH=8.0): 二水乙二胺四乙酸二钠 18.61g, 加 ddH<sub>2</sub>O 80ml, 磁力搅拌器上剧烈搅拌, 用 NaOH 调节溶液的 pH 值至 8.0, 然后定容至 100ml, 灭菌
- 30%丙烯酰胺: 29% (W/V) 丙烯酰胺, 1% (W/V) N, N'-亚甲双丙烯酰胺
- 10%过硫酸胺: 1g 过硫酸胺溶解于终量为 10ml 的水中, 4℃ 保存
- 染色液: 乙醇: 冰乙酸: 灭菌水 = 9: 2: 9, +0.25%的考马斯亮蓝
- 脱色液 I: 乙醇: 冰乙酸: 灭菌水 = 25: 8: 65
- 脱色液 II: 乙醇: 冰乙酸: 灭菌水 = 10: 15: 75
- 5×Tris 甘氨酸电泳缓冲液: 15.1g Tris 碱, 94g 甘氨酸, 50ml 10% (W/V) SDS 溶于 900ml 水中, 定容至 1 L

#### 1.4 主要实验仪器:

- DNA 自动扩增仪: 9600 型。美国 PE 公司
- GeneQuant II 型紫外分光光度计
- 水平式电泳槽: 德国 Phamacia 公司
- HITACHI Himac CR201 型高速冷冻离心机: 日本 HITACHI 公司
- EPPENDORF 5415C 台式高速离心机: 德国 EPPENDORF 公司
- Mini-PROTEAN 2 Cell 电泳装置: 美国 Bio-Rad 公司
- FR-200 型凝胶成像装置, 上海复日生物技术研究所
- SDJ-超净工作台, 上海淀山湖净化设备厂产品
- AB1377 型 DNA 自动序列分析仪, 美国 PERKIN ELMER 公司产品

#### 1.5 使用的主要生物信息分析工具

- NCBI (GenBank, dbEST, UNIGene 及其他相关链接): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- PC Gene 软件所带数据库: Restriction Enzymes

## 2 实验方法

### 2.1 结核分支杆菌 DNA 的抽提

将 TB 菌株转种于罗氏培养基上。37℃ 孵育 3 周, 用生理盐水将细菌洗下, 5000g 离心 10 分钟, 收集菌株。在细菌沉淀中加入 200 $\mu$ l 下列溶液- (20mM Tris, PH 8.0; 2mM EDTA; 1.2% Triton X-100; 4mg 溶菌酶), 彻底振荡悬浮。37℃ 温育 30 分钟以上。其后按细菌 DNA 抽提试剂盒说明, 加入 250 $\mu$ l 消化液和 25 $\mu$ l 蛋白酶 K, 迅速振荡混匀。置 65℃ 温浴 15 分钟。加 350 $\mu$ l 裂解液, 混匀后离心 10 分钟, 收集上清至另一离心管, 加如 10 $\mu$ l RNase 酶, 混匀, 55-65℃ 温浴 5 分钟。加入 350 $\mu$ l 无水乙醇, 混匀后取 750 $\mu$ l 样品液至吸附柱上, 离心 15 秒, 再分别以洗涤液洗 2 次, 离心弃收集管中的液体, 最后以 100 $\mu$ l 洗脱液洗脱, 将收集到的 DNA -20℃ 保存备用。

### 2.2 KatG 基因克隆:

#### (1) 从 GenBank 获得 KatG 基因序列

从 NCBI (GenBank, dbEST, UNIGene 及其他相关链接): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 获得 katG 的全序列:

```

1 gtgcccgagc aacaccacc cattacagaa accaccaccg gagccgctag caacggctgt
61 cccgtcgtgg gtcatatgaa ataccccgtc gagggcggcg gaaaccagga ctggtggccc
121 aaccggctca atctgaaggt actgcaccaa aaccggcccg tcgctgacct gatgggtgcg
181 gcgttcgact atgccgcgga ggtcgcgacc atcgacgttg acgccctgac gcgggacatc
241 gaggaagtga tgaccacctc gcagccgtgg tggcccggcg actacggcca ctacgggccc
301 ctgtttatcc ggatggcgtg gcacgctgcc ggcacctacc gcatccacga cggcccgcggc
361 ggcgcccggg gcggcctgca gcggttcgcg ccgcttaaca gctggcccga caacgccagc
421 ttgacaagg cgcgcccggc gctgtggccg gtcaagaaga agtacggcaa gaagctctca
481 tgggcggacc tgattgtttt cgccggcaac tgcgcgctgg aatcgatggg ctcaagacg
541 ttcgggttcg gcttcggccg ggtcgaccag tgggagcccg atgaggtcta ttggggcaag
601 gaagccacct ggctcggcga tgagcgttac agcggtaagc gggatctgga gaaccgctg
661 gccgcggtgc agatggggct gatctacgtg aaccggagg ggccgaacgg caaccggac
721 cccatggccg cggcggtcga cattcgcgag acgttcggc gcatggccat gaacgacgc
781 gaaacagcgg cgctgatcgt cggcggtcac actttcggtg agaccatgg cgccggcccg
841 gccgatctgg tcggccccga acccgaggct gctccgctgg agcagatggg ctggggctgg
901 aagagctcgt atggcaccgg aaccggtaag gacgcatca ccagcggcat cgaggctgta

```

961 tggacgaaca ccccgacgaa atgggacaac agtttctcag agatcctgta cggctacgag  
 1021 tgggagctga cgaagagccc tgctggcgct tggcaataca ccgccaagga cggcgccggt  
 1081 gccggcacca tcccgacccc gtccggcggg ccagggcget ccccgacgat gctggccact  
 1141 gacctctcgc tgcgggtgga tccgatctat gagcggatca cgcgtcgtg gctggaacac  
 1201 cccgaggaat tggccgacga gtccgccaag gcctgttaca agctgatcca ccgagacatg  
 1261 ggtcccgttg cgagatacct tgggccgctg gtccccaagc agaccctgct gtggcaggat  
 1321 ccggtccctg cggtcagcca cgacctcgtc ggcgaagccg agattgccag ccttaagagc  
 1381 cagatccggg catcgggatt gactgtctca cagctagttt cgaccgcatg ggcggcggcg  
 1441 tcgtcgttcc gtggtagcga caagcgcggc ggcgccaacg gtggtcgcac ccgcctgcag  
 1501 ccacaagtcg ggtgggaggt caacgacccc gacggggatc tgcgcaaggt cattcgcacc  
 1561 ctggaagaga tccaggagtc attcaactcc gcggcgccgg ggaacatcaa agtgccttc  
 1621 gccgacctcg tcgtgctcgg tggctgtgcc gccatagaga aagcagcaaa ggcggctggc  
 1681 cacaacatca cgggtccctt caccgccggc cgcacggatg cgtcgcagga acaaaccgac  
 1741 gtggaatcct ttgccgtgct ggagcccaag gcagatggct tccgaaacta cctcggaaag  
 1801 ggcaaccctg tcccgccga gtacatgctg ctgcacaagg cgaacctgct tacgctcagt  
 1861 gccctgaga tgacggtgct gtaggtggc ctgcgcgtcc tcggcgcaaa ctacaagcgc  
 1921 ttaccgctgg gcgtgttac cgaggcctcc gagtcaactga ccaacgactt ctctgtaac  
 1981 ctgctcgaca tgggtatcac ctgggagccc tcgccagcag atgacgggac ctaccagggc  
 2041 aaggatggca gtggcaaggt gaagtggacc ggcagccgcg tggacctggt ctccgggtcc  
 2101 aactcggagt tccggcgctg tctcagagtc tatggcgccg atgacgcgca gccgaagttc  
 2161 gtgcaggact tcgtcgtgct ctgggacaag gtgatgaacc tcgacaggtt cgacgtgcgc  
 2221 tga//

katG 基因是 MTB 染色体中的一功能区段，应用 kpnI 限制性内切地 MTB INH 敏感标准株 H37Rv 进行消化后，得到一个大约 4810bp 的 DNA 片段，它作为开放可读框架存在被分析时，具有高度编码概率价值。KatG 基因就位于该片段的第 1979 - 4201 位，全长 2223bp，gtg 为其起始密码子，tga 为终止密码子。

## (2) PCR 引物设计

应用 PC Gene 软件所带数据库对 katG 基因序列进行分析，获得序列内不存在得酶切位点，可供设计克隆酶切位点时作为参考。

List of non cutting selected enzymes

=====  
 Acc65I , AclI , AhaIII , ApaI , ApaLI , ApoI , AsuII ,  
 AvrII , BclI , BglII , BsaBI , BsmI , Bsp120I , Bsp1407I,  
 BspHI , BspM90I , BsrDI , BstEII , BstXI , DraIII , DrdI ,  
 Eam1105I, Eco31I , EcoRI , EcoRV , EcoT22I , EspI , FseI ,  
 HindIII , HpaI , KpnI , MfeI , NotI , PacI , PmaCI ,  
 PmeI , Ppu10I , PvuI , RsrII , SauI , ScaI , SfiI ,  
 SgfI , SnaBI , SpeI , SplI , SrfI , Sse8387I, SspI ,  
 SwaI , VspI , XbaI , XmnI

根据基因文库所提供的结核分支杆菌 KatG 基因序列以及获得的内切酶位点资料, 用引物设计软件设计一对引物:

引物 A 5' > AGT TCA TCT AGA GTG CCC GAG CAA CAC CCA CC<3'  
 XbaI

引物 B 5' - ACG TCG AAG CTT GCG CAC GTC GAA CCTGTCGAG 3'  
 HindIII

引物 A 的 5' 端设计了 XbaI 酶切位点, 引物 B 的 5' 端设计了 Hind III 酶切位点。引物 A 紧跟酶切位点 XbaI 后即为 katG 的起始密码子, 引物 B 则因考虑到今后在表达 katG 蛋白后需依靠镍亲和柱来纯化蛋白, 故避开终止密码子 TGA 来设计引物,

### (3) 引物合成和基因扩增

引物由 Sangon 生物工程公司合成。合成后稀释成终浓度 25pmol/ $\mu$ l, 分装, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。从结核分支杆菌标准株 H37Rv 提取的染色体 DNA 作为 PCR 扩增的模板,

#### [PCR 扩增体系]

模板 (H37Rv DNA)	1 $\mu$ l (<1ng)
10 $\times$ PCR 缓冲液	2 $\mu$ L
10 $\times$ dNTP (0.6mmol/L 每份)	2 $\mu$ L
引物 A (20pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
引物 B (20pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
PWO DNA 聚合酶 (5 单位/ $\mu$ L)	0.1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	加至 20 $\mu$ L



[PCR 扩增条件]

- 94℃ 5min
- 35 cycles
  - 94℃ 1min
  - 55℃ 1min
  - 72℃ 2min
- 72℃ 5min
- soak at 4℃

用 0.7% 的 Agrose 电泳检测 PCR 结果

(4) PCR 产物的纯化、酶切及割胶回收

用 QIAGEN 的 QIaquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 纯化 PCR 产物，方法按试剂盒说明书进行。

(5) 表达质粒的构建

A. 表达质粒构建过程见下图：

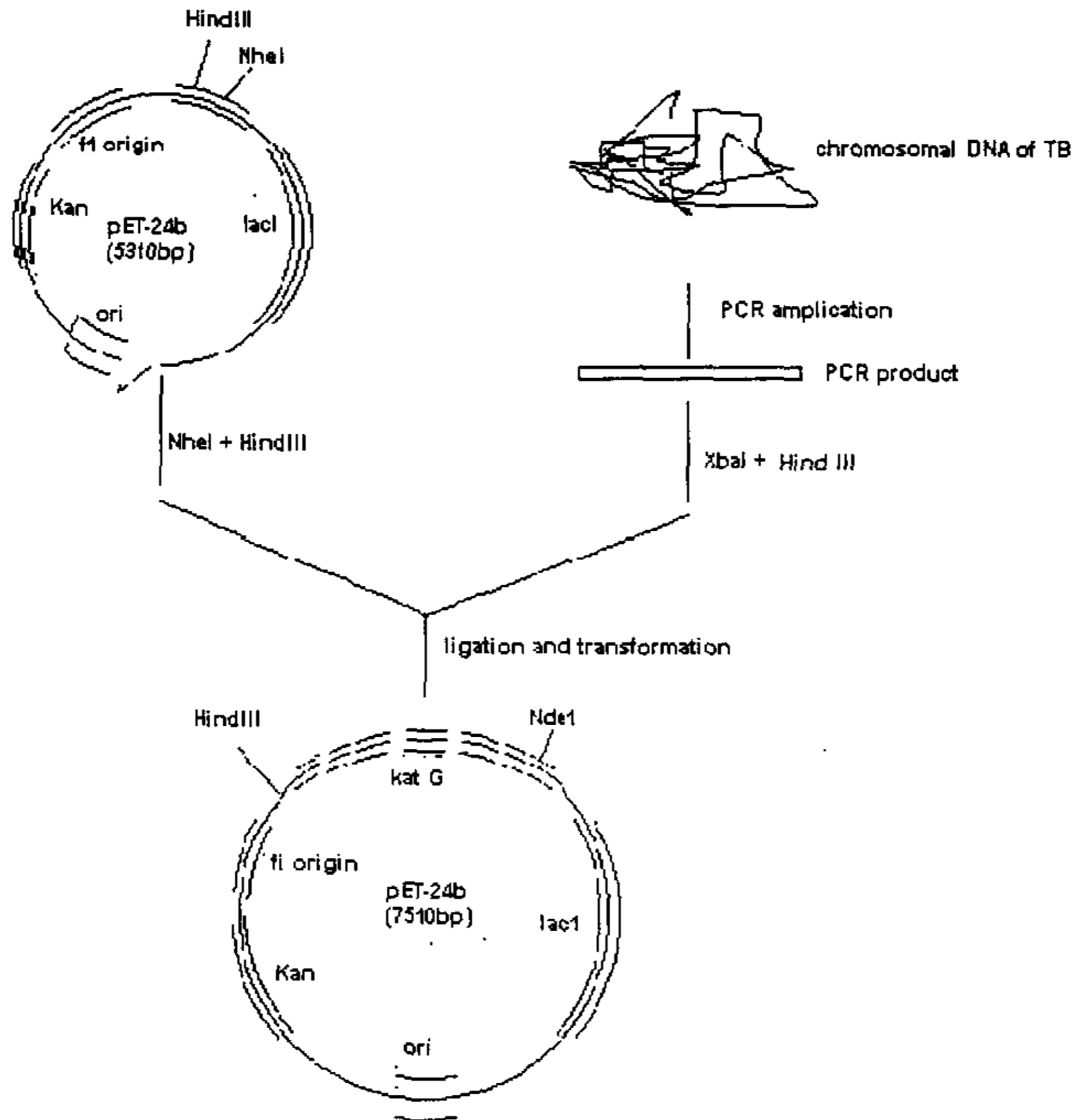


图 1 重组质粒 pET-katG 的构建

B. pET-24b 的转化与扩增：按常规方法进行（参考“分子克隆实验指南”）。

C. 质粒与 PCR 产物的酶切

1) pET-24b 酶切体系 (以下内切酶浓度为 20u/ $\mu$ l)

10 $\times$ 酶切 buffer	20 $\mu$ l
pET-24b	20 $\mu$ l
NheI	3 $\mu$ l
HindIII	2 $\mu$ l
BamHI	2 $\mu$ l
MilliQ H <sub>2</sub> O	153 $\mu$ l

条件：37 $^{\circ}$ C, 1h。

## 2) PCR 产物酶切体系

10×酶切 buffer	10 $\mu$ l
PCR 产物	20 $\mu$ l
XbaI	3 $\mu$ l
HindIII	2 $\mu$ l
MilliQ H <sub>2</sub> O	64 $\mu$ l

条件: 37°C, 1h.

3) 酶切: 37°C 水浴 1 小时后, 取上述两个样品的酶切反应液各 5 $\mu$ l, 进行琼脂糖凝胶电泳, 观察酶切反应, 如酶切结果满意则将反应液以 PCR 纯化试剂盒回收酶切产物, 终体积为 20 $\mu$ l.

## 4). 目标基因与载体的连接

### 连接体系

连接 buffer	2 $\mu$ l
pET-24b 酶切产物	3 $\mu$ l
PCR 产物的酶切产物	4 $\mu$ l
T4DNA 连接酶	1 $\mu$ l
MilliQ H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l

连接: 将以上连接体系混匀, 置 12-18°C 水浴中过夜。转化用。

## (4) 重组质粒的筛选与鉴定

### A. 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态的制备:

- 挑取 DH5 $\alpha$  菌单菌落, 接种于 2.5ml LB 培养基中, 37°C 摇菌过夜;
- 接种过夜 DH5 $\alpha$  菌 1ml 转接于 100ml LB 中摇床—200 转/min 振荡培养;
- 待菌液 OD<sub>600</sub> 值达到 0.4 左右 (摇菌 2 小时左右), 将菌液置于冰上 5 min;
- 分装于 4 只 50ml 离心管中, 4°C 5000rpm 离心 5min, 收菌, 弃上清;
- 振匀沉淀, 每管加预冷 0.1M CaCl<sub>2</sub> 10mL。0°C 冰浴 0.5h;
- 再 5000rpm 离心 5min, 弃上清, 每管加预冷 0.1M CaCl<sub>2</sub> 0.5mL,

用手轻摇匀，4管并1管，0℃冰浴>2h，待用。

#### B. 克隆质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$

- 将以上感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 轻摇，分装于 3 只 eppendorf 管中，每管 200 $\mu$ l；
- 加连接产物 8 $\mu$ l。冰浴 40min；
- 42℃ 2min 热休克后，置于冰上 2 min；
- 每管加入 10 倍体积的 LB 培养基，37℃ 水浴 60min 复苏；
- 涂布于含卡那霉素 100 $\mu$ g/ml 的 LB 的平板上，37℃ 倒置培养过夜。

#### C. PCR 方法筛选阳性克隆

- 按如下方案制备 PCR 混和物

10 $\times$ PCR 缓冲液	2 $\mu$ L
10 $\times$ dNTP (0.6mmol/L 每份)	2 $\mu$ L
引物 A (20pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
引物 B (20pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
PWO DNA 聚合酶 (5 单位/ $\mu$ L)	0.1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	加至 20 $\mu$ L

条件

94℃ 5min

35 cycles: 94℃ 5min, 55℃ 1min, 72℃ 2min

72℃ 5min

soak at 4℃

用 0.7% 的 Agrose 电泳检测 PCR 结果，将有阳性扩增产物的克隆作酶切鉴定。

#### D. 酶切鉴定阳性克隆

挑选 PCR 产物阳性的单个菌落，转接 2ml LB 培养基，按常规抽提质粒由于在克隆是 PCR 产物用 XbaI 和 HindIII 处理，而载体用 NheI 和 HindIII 处理，处理后连接产生的重组体不能再被 NheI 或 XbaI 酶解，而位于 katG 核苷酸序列 5' 端第 74 个 bp 位置有单一 NdeI 酶切位点，经 NdeI 酶切对 katG 片段长度影响不足 4%，故可以 NdeI 与

HindIII对重组体进行双酶切鉴定，以 NdeI 与 HindIII 双酶切鉴定重组质粒。酶切方法同上。挑选阳性克隆质粒，按常规扩增后转化感受态表达载体工程菌（大肠杆菌 BL 21 (DE3)）。

#### (5) 转化表达用工程菌 [大肠杆菌 BL 21 (DE3)]

大肠杆菌 BL 21 (DE3) 感受态的制作同上。取扩增后的阳性克隆质粒转化感受态大肠杆菌 BL 21 (DE3)。

#### (6) KatG 基因的表达

##### A. 诱导

将转化有 pET24b-katG 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株涂于含卡那霉素的 LB 平板上，30℃过夜培养。挑取抗卡那霉素的菌株接种于 20ml 的 LB 培养基（加入 20% 的葡萄糖 0.2ml，浓度 50mg/ml 的卡那霉素 40 $\mu$ l，浓度 20mg/ml 的氯霉素 34 $\mu$ l）中，37℃，160r/min 振荡过夜。取 3ml 过夜培养物种入 100ml 的 LB 培养基（含 20% 的葡萄糖 1ml，浓度 10mg/ml 的卡那霉素 400 $\mu$ l）中，37℃以 160r/min 振荡，每 20 分钟测定一次 A<sub>600</sub> 值，直至 A<sub>600</sub> 值到达 0.4 - 0.5（勿超过 0.5）。随后每 100ml LB 培养基中加入 1mol/L IPTG 400 $\mu$ l，在加入 IPTG 后的第 3 小时收集菌液。将菌液在 4℃下，5 000g，离心 5 分钟，弃上清。将沉淀物以 10ml 缓冲液（50mmol/L Tris.cl, pH 8.0, 2mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100）重新悬浮，加入溶菌酶（100 $\mu$ g/mL）。在冰浴中以中等强度超声破菌，每次 10 秒，共 3 次，破菌后，4℃，离心 5 分钟，收集上清液备用。

##### B. 表达产物的 SDS-PAGE 检测

进行常规蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）。收集 IPTG 诱导后的菌液 10 $\mu$ l，与加样液 10 $\mu$ l 混合，100℃水浴，3 分钟后点样，25mA 恒流通电进行 SDS-PAGE。电泳后以考马斯亮蓝染色 15 分钟，然后以脱色液脱色观察结果。并对对染色的凝胶扫描以检测目的蛋白的表达水平。

#### (7) katG 蛋白的纯化

将收集的菌体按 1g 菌用 10mmol/L Tris-HCl (pH8.0)，1mmol /L

EDTA 溶液悬浮，超声破菌，12,000rpm 离心 15min，收集上清；上清液于 95℃ 热变性 6 分钟，14,000rpm 离心 15min，去除变性杂蛋白，收集上清；将热变性上清用 1mol/L 冰醋酸调节 pH 到 5.0，采用镍亲和纯化柱对表达蛋白进行纯化，以 50-500mmol/L 的咪唑洗脱液梯度非连续洗脱分管收集，SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯度；合并较纯的几管蛋白，用硫酸铵沉淀备用。

### 2.3 基因产物过氧化氢酶活性测定

- (1) 240nm 吸光度检测：对破菌液上清进行过氧化氢酶活性测定。用磷酸盐 ( $K_2HPO_4+KH_2PO_4$ , 0.1mol/L, pH 7.0) 与 NaCl (2 mol/L) 等量配制成 25ml 的缓冲液，加入 30% 的双氧水 0.17mL 混合配成底物。取 1ml 底物，分别加入含 pET-katG 表达质粒的菌株破菌上清 30 $\mu$ l 与含 pET 空载体的菌株破菌上清 30 $\mu$ l，在 240nm、25℃ 下检测吸光度，共检测 8 分钟。
- (2) 目测法：对破菌液上清进行过氧化氢酶活性的初步测定。用磷酸盐 [ $K_2HPO_4+KH_2PO_4$ , 0.1mol/L] 与 NaCl (2 mol/L) 的缓冲液配制 10% 的 Tween80 溶液，取 5mL 与 30% 的双氧水 5mL 混合。分对照管与 katG 管，分别加入含 pET 空载体的菌株破菌上清及含 pET-katG (H37Rv) 表达质粒的菌株破菌上清各 50 $\mu$ l，25℃，5 分钟后观察气泡产生情况。如产生大量气泡视过氧化氢酶活性为 (++)，气泡较少为 (+)，几无气泡为 (-)。

## 结果

### 1、野生型 TB H37Rv 株 katG 基因的克隆与表达

#### 1.1 野生型 TB H37Rv 株的 PCR 结果

以结核分支杆菌标准株 H37Rv 染色体 DNA 为模板，经 PCR 扩增反应，产物经琼脂凝胶电泳分析呈现特异性扩增条带，位置大约相当于 2.2kb，与预设的大小吻合。

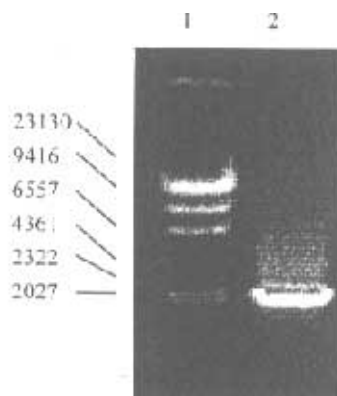


图 1 野生型 TB H37Rv 株的 PCR 结果

1.  $\lambda$ /HindIII marker 2. H37Rv 株的 PCR 产物

#### 1.2 pET-24b 的酶切电泳图

pET-24b 经酶切后成为线性结构，提示酶切有效。

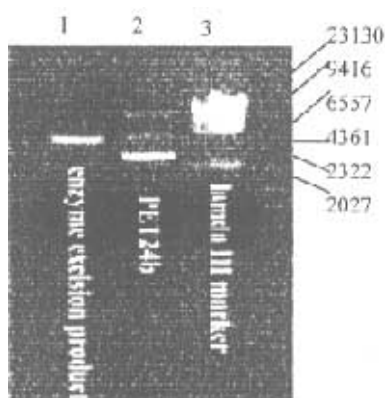


图 2 pET-24b 的酶切电泳图

1. pET24b/NheI and HindIII 2. pET24b 3.  $\lambda$ /HindIII marker

### 1.3 katG 的酶切图

katG 基因产物的两端酶切位点经酶切后大小基本不变, 仍为 2.2k bp 大小。

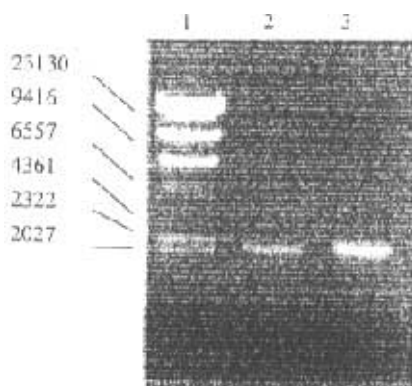


图 3 katG 的酶切图

1.  $\lambda$ /HindIII marker 2. KatG/XbaI and HindIII 3. KatG 基因

### 1.3 katG 重组质粒电泳图

质粒重组后的泳动速度慢于质粒空载体, 提示已克隆有新基因片段。

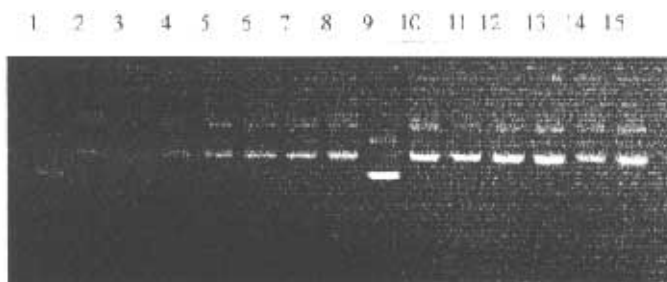


图 4 katG 的酶切图

1,9 质粒空载体; 2-8,10-15. 重组质粒



#### 1.4 PCR 法筛选阳性克隆

将克隆的菌株进行 PCR 扩增，结果发现大部分克隆菌株的扩增产物为阳性，即以 *KatG* 基因的引物可扩增出相应大小的 DNA 片段，大小约 2.2kb，将阳性克隆进一步进行酶切鉴定。

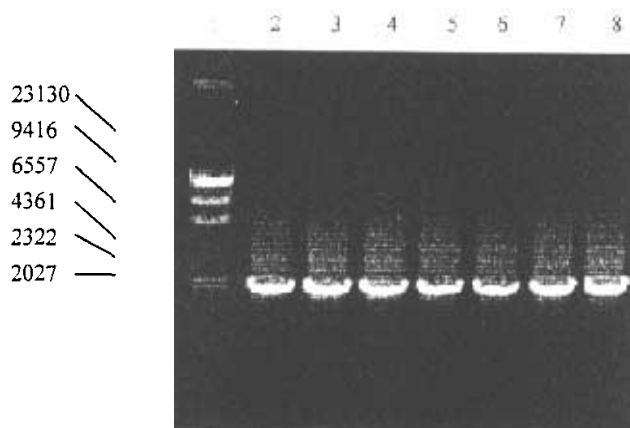


图 5 PCR 法筛选阳性克隆图

1. DNA marker; 2-7. 克隆质粒的 PCR 产物

#### 1.5 克隆质粒的酶切鉴定图谱

在抗性培养基中生长的菌落，经培养后抽提质粒，可见克隆有 *katG* 基因的质粒片段明显增大，在电泳中的速度显著慢于空载体。质粒经 *NdeI* 与 *HindIII* 双酶切产生的 2.2kb DNA 插入片段与 5.3kb 的载体 DNA 片段与预期的结果一致。

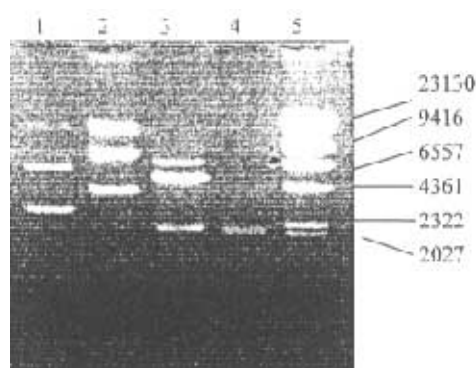


图 6 克隆质粒的酶切鉴定图谱

1. pET24b; 2. pET24b::katG 3. pET24b::katG/*NdeI* and *HindIII*

4. *katG*/*XbaI* and *HindIII* 5.  $\lambda$ /*HindIII* marker

## 2 katG 蛋白的表达

将含有 katG 基因的 pET24b-katG 表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 在 IPTG 诱导下表达, 对表达产物进行 SDS-PAGE 以及考马斯亮蓝染色, 将诱导后细菌和诱导前细菌作比较, 诱导后细菌裂解液在 Mr 80Kda 处见一浓集的条带。对此诱导表达带进行黑度密度自动扫描分析, 此处表达蛋白量约占总菌体蛋白量的 17.7%。

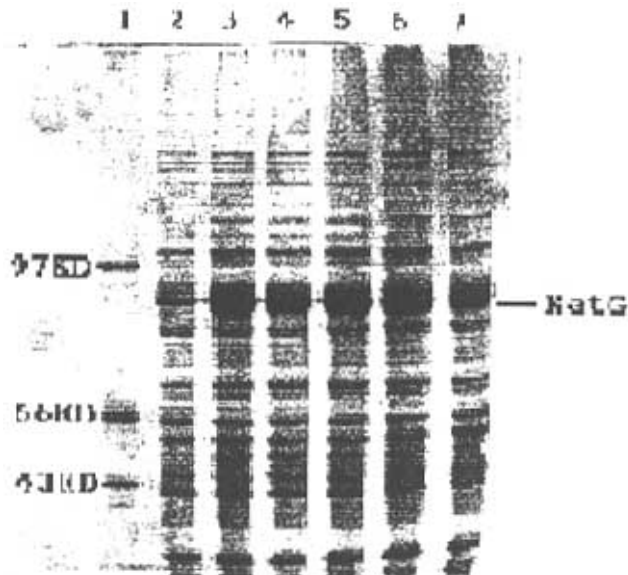


图 7 katG 蛋白的表达

- 1: 蛋白分子量标准; 2: IPTG 诱导 0 小时; 3: IPTG 诱导 2 小时;
- 4: IPTG 诱导 3 小时; 5: IPTG 诱导 4 小时; 6: IPTG 诱导 5 小时;
- 7: IPTG 诱导 6 小时。

### 3 katG 蛋白的纯化

采用镍亲和纯化柱对表达蛋白进行纯化发现，以 50-500mmol/L 的咪唑洗脱液洗脱纯化柱后，所收集的洗脱液经再次进行 SDS-PAGE 进行分析。结果发现，约以 350 mmol/L 咪唑洗脱后纯化的效率最高。通过 SDS-PAGE 黑度密度自动扫描分析可以发现纯化率可达 90% 以上。

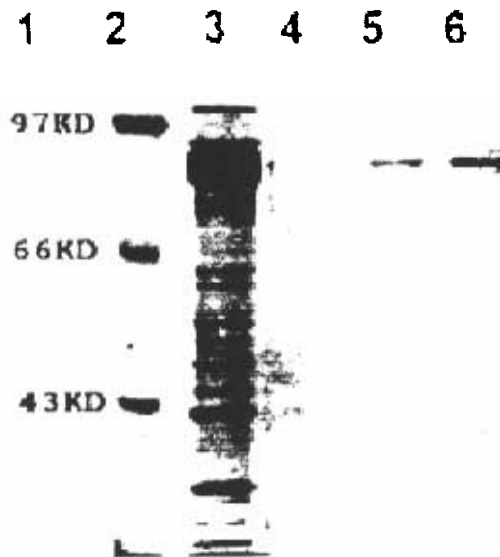


图8 katG 蛋白的纯化

1. 蛋白分子量标准;
2. 破菌上清;
3. 50mmol/L 咪唑洗脱液洗脱产物;
4. 200mmol/L 咪唑洗脱液洗脱产物;
5. 350mmol/L 咪唑洗脱液洗脱产物;
6. 500mmol/L 咪唑洗脱液洗脱产物。

4. 对 KatG 基因表达产物的过氧化氢酶活性测定结果 在过氧化氢反应系统中分别加入含 pET24b-katG 表达质粒的菌株破菌上清与含 pET24b 空载体的菌株破菌上清, 以分光光度计每 2 分钟检测一次 240nm 下的吸光度。过氧化氢酶活性可以 A240 的下降程度来反应(即  $H_2O_2$  经分解后含量降低), 结果如图所示, 发现含重组 katG 的菌株破菌上清的酶活性远高于含 pET24b 空载体的菌株破菌上清, 提示重组 katG 表达产物具有过氧化氢酶活性。

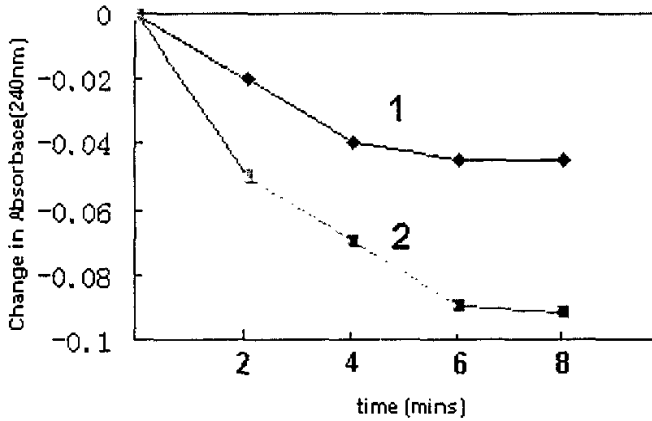


图 9 KatG 蛋白的过氧化氢酶活性

1. 对照质粒 2. KatG 重组质粒

## 讨 论

结核分支杆菌的过氧化氢酶-过氧化物酶在异烟肼的抗结核作用机制中起着关键作用<sup>[2]</sup>。研究显示,将 KatG 基因转移到 INH 耐药菌株胞内,可令其对 INH 重新恢复敏感性<sup>[9]</sup>。而对结核分支杆菌的临床耐异烟肼菌株进行 KatG 基因分析亦发现该基因的缺失或突变等是发生耐药的主要原因<sup>[10]</sup>。但近年来的研究多停留在对异烟肼耐药菌株 katG 基因突变体的筛选上<sup>[11]</sup>,对于基因变异导致耐药的机制研究不多,特别是不同 katG 基因突变体在功能上存在何种差异,或者说为何会引起耐药,这就必须从基因的功能着手进行分析,研究基因的功能必须能取得基因表达的产物。

本课题在国内首次克隆 katG 基因并对实现了基因的高表达与纯化,最后对基因产物的功能——过氧化氢酶活性进行了检测。

katG 基因是 MTB 染色体中的一功能区段,全长 2223bp,从基因文库查得该序列,可知其中 A428bp, C696bp, C740bp, T359bp, C+G 占 64.6%。曾有研究将此片段转染到一个能在 500ug/ml INH 中生长的耻垢分支杆菌中,结果使后者获得了对 INH 的敏感性(MIC 为 8-32ug/ml),而对其他药物的 MIC 不变,证实了此 DNA 序列确是 katG 基因,它与 MTB 对 INH 的耐药性呈直接相关。对 MTB 的 HRv-MC 株和 ATCC27294 株进行 katG 基因分析时,则发现它们与 HRv 株的 katG 基因序列至少存有 16 个碱基的差异<sup>[12,13]</sup>。因此,本课题在进行 katG 基因的研究时,充分考虑了不同菌株间基因差异的可能性,未选用临床分离株,而选用了通用的标准株 HRv 株。

在克隆过程中,本课题选用了 pET24b 作为载体质粒,该质粒全长 5308bp,是迄今为止在大肠杆菌中进行重组蛋白克隆及表达最为有效的质粒之一<sup>[14,15]</sup>。含有 T7 始动子及 lac 操纵子。克隆在此质粒中的目标基因可被强有力地控制在噬菌体 T7 转录及翻译信号之下;通过宿主细胞提供的 T7RNA 聚合酶诱导表达。T7RNA 聚合酶受控于 lacUV5,通过 IPTG 来诱导表达。许多基因难以在以始动子为基础的系统(如 lac, tac, PL)的大肠杆菌中表达,但在此质粒中可稳定地克隆及表达。更为重要的是因为表达产物是以可溶性的形式存在,给表达后的分离纯化带来困难<sup>[16]</sup>。因此选择 pET 质粒作为载体质粒的另一重要原因就是利用该质粒在蛋白表达结束时可在氨基酸序列末端额外表达 6 个组氨酸,带 6 个组氨酸的 katG 蛋白就能利用镍亲和株,利用表达蛋白上额外挂的 6 个组氨酸与亲和株结合,再用咪唑洗脱

液进行洗脱，从而实现高效的一次性纯化，从而达到分离纯化的目的。

由于在克隆过程中如果应用普通的 Tag 酶则因其无校正功能而可能出现变异，为了保证获得的 katG 基因与标准株 katG 基因高度一致，本研究选用了高保真的 DNA 聚合酶——PWODNA 聚合酶来扩增目的基因，以减少突变概率。

本研究以结核杆菌 H37Rv 株基因组 DNA 作为模板，对靶基因进行扩增后对扩增产物以核酸内切酶 XbaI 及 HindIII 进行双酶切，为了防止载体酶切后的自联，对载体质粒进行了 NheI、HindIII 以及 BamHI 三酶切，其中 NheI 与 XbaI 的酶切位点为融合酶切位点，克隆的基因片段相连后不能再用 NheI 或 XbaI 酶切鉴定，而位于 katG 基因序列 5'端第 74 个 bp 位置有一单一 NdeI 酶切位点，经 NdeI 酶切后对 katG 片段长度影响不足 4%，故可以 NdeI 以及 HindIII 对重组体进行双酶切。经酶切与 PCR 法对重组质粒进行了鉴定后，以 IPTG 进行诱导表达。重组基因高效表达了 katG 蛋白，相对分子质量约为  $80 \times 10^3$ ，表达量可占总菌体蛋白的 17.7%。表明该基因重组的菌株为 katG 的高表达菌株，进一步对表达产物进行纯化后可提取到纯度超过 90% 的 katG 蛋白。

实现 katG 基因的表达与纯化后对表达了 katG 基因的工程菌以超声破菌，破菌液经酶活测定具有过氧化氢酶活性。这些数据都证实了 katG 基因在大肠杆菌中得到了成功的表达。

本研究成功克隆表达了 katG 基因，并建立了稳定可靠的纯化方法，获取了 katG 蛋白，为进一步研究 katG 蛋白以及从基因功能上来研究耐药机制奠定了基础，填补了国内在这一领域的研究空白。

## 小 结

- 结核分支杆菌 katG 基因表达的过氧化氢酶-过氧化物酶在异烟肼的抗结核作用机制中起着关键作用
- 目前在国内尚未开展从 katG 基因功能角度进行对异烟肼耐药机制的研究
- 本课题成功重组了与结核杆菌对异烟肼耐药相关的 katG 基因，并实现了基因的高表达与纯化，为进一步研究 katG 蛋白及其在异烟肼耐药机制中的作用奠定了基础，填补了国内在这一领域研究的空白。

## 参考文献

1. Neville K, Bromberg A, Bromberg R, et al. The third epidemic multidrug-resistant tuberculosis. *Chest*,1994,105:45.
2. Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of mycobacterium tuberculosis. *Nature*, 1992, 358:591.
3. 吴雪琼, 庄玉辉, 张晓刚, 等. 结核分枝杆菌耐异烟肼分子机制的研究. *中国防痨杂志*, 1998; 20 ( 1 ) : 35
4. Middlebrook G. Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Tubere*, 1954,69:471.
5. 张宗德, 马与, 程绍基, 等. 异烟肼耐药与结核分支杆菌 *katA* 基因突变的研究. *中华结核和呼吸杂志* 1996, 19: 346 - 349.
6. Musser JM, Kapur V, Williams DL, et al. Characterization of the catalase-peroxidase Gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and susceptible strains of mycobacterium tuberculosis by automated DNA resistance. *J Infect Dis*, 1996,173:196.
7. Frank R,Cockerill III,James R,et al.Rapid identification of a point mutation of the Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase gene associated with isoniazid resistance. 1995.71:240-245
8. Lee ASG, Tang LL, Lim IHK, et al. Lack of clinical significance for the common arginine-to-leucine substitution at codon 463 of the *katG* gene in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis in Singapore. *J Infect Dis*,1997;176:112 *Agents Chemother*,1994;38:228
9. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:496.
10. Saint-Joanis B, Souchon H, Wilming M, et al. Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase, *katG*, from Mycobacterium tuberculosis. *Biochem J* 1999;338:753.
11. 吴雪琼, 庄玉辉, 张俊仙, 等. 结核分枝杆菌耐药基因检测. *解放军军医进修学院学报*, 1998; 19 ( 3 ): 185
12. Telenti A, philipp WJ, Sreevatsan S, et al. The emb operon , a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol. *Nat Med*, 1997, 3:567-570.



13. Heym B, Zhang Y, Poulet S, et al. Characterization of the KatG gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 1993,175:4255.
14. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986;189:113.
15. Rosenberg AH, Lae BN, Chui DS, et al. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 1987;56:125.
16. Studier FW. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to improve a inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 1991;219:37-44.

## 第二部分 定向诱变法克隆 katG 基因突变体以及对其表达产物功能的比较分析

最早证实 katG 基因确系与异烟肼耐药密切相关的是在 1992 年, Zhang 人等将 KatG 基因的功能性拷贝导入 2 株 INH 耐药菌中, 使之恢复了对 INH 的敏感性, 经 DNA 探针杂交, 这 2 株菌均呈阳性反应<sup>[1]</sup>. 近年来, 研究发现: INH 耐药性结核分支杆菌中, KatG 基因突变较其完全缺失更为普遍<sup>[2]</sup>. 而多数的文献都对在异烟肼耐药菌株的 katG 基因中发现 315 位由丝氨酸 (AGC) 突变为苏氨酸 (AGC) 以及 463 位的精氨酸 (CGG) 突变为亮氨酸 (CTG) 作了报道, 认为这两个突变点是可以作为检测结核杆菌对异烟肼耐药的简易指标<sup>[3, 4, 5]</sup>. 但在近年, 国外有多篇文献对 R463/L 突变点的异议, 此后美国的 Rouse 等人也证实在相当部分的敏感菌株中发现有 R463L 的变异<sup>[6, 7]</sup>. 因此, 直接对临床耐药菌株中筛选到的突变点进行直接的评估非常重要<sup>[8]</sup>.

本课题在国内率先采用定点诱变技术在野生型标准株的 katG 基因中获得两个标准突变体, 即 S315T 与 R463L, 并进一步对突变体的 katG 进行克隆与表达, 检测突变体 katG 蛋白与野生型蛋白在功能上的区别, 从而直接对该两个突变点在耐药机制中的意义作出论证, 冀以为今后用分子生物学方法检测耐药株作出一些基础性的铺垫.

## 材料与方法

### 1 材料和试剂

#### 1.1 菌株与质粒

- (2) 结核分支杆菌野生型 H37Rv 株: 由本校客座教授、美国 FDA 分支杆菌实验室李忠明博士提供。
- (3) 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ : 基因型 supE44 $\Delta$ lacU169( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15)hsdR17recA1enA1gyrA96thi-1 relA1
- (4) 大肠杆菌 BL21 (DE3): 基因型 F-,ompT,hsdS<sub>B</sub>,(*r*<sub>B</sub><sup>-</sup>,*m*<sub>B</sub><sup>-</sup>),dcm,gal, $\lambda$ (DE3)
- (5) 载体质粒 pET24b: 美国 Invitrogene 公司产品

#### 1.2 主要试剂与酶类

- (1) PWO DNA 聚合酶: 罗氏公司产品
- (2) 各种限制性内切酶: 罗氏公司产品
- (3) T4DNA 连接酶(T4 DNA Ligase): 罗氏公司产品
- (4) dNTPs 混合液: Promega 公司产品
- (5) 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)
- (6) QIAquick PCR purification kit, 德国 QIAGEN 公司产品
- (7) QIAquick Gel extraction kit, 德国 QIAGEN 公司产
- (8) 细菌 DNA 抽提试剂盒: 购自德国 QIAGENE 公司
- (9) 质粒 DNA 抽提试剂盒: 购自德国 QIAGENE 公司
- (10) 十二烷基硫酸钠: 华舜公司进口分装
- (11) 丙烯酰胺与 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺: SIGMA 公司
- (12) 核酸和蛋白质分子量标准: 购自 Promega 公司
- (13) 异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG): 华美生物工程公司产品
- (14) Tris: 分析纯, 德国 Boehringer Mannheim 公司产品
- (15) 寡聚核苷酸: 由 Sangon 生物工程公司合成
- (16) 测定酶活所用试剂: 国产 AR 级产品。
- (17) Xpress 蛋白纯化试剂盒: 美国 Invitrogen 公司产品
- (18) 卡那霉素

1.3 常用试剂与培养基的配制: 见第一部分。

1.4 主要实验仪器:

- (2) DNA 自动扩增仪: 9600 型。美国 PE 公司
- (3) GeneQuant II 型紫外分光光度计
- (4) 水平式电泳槽: 德国 Phamacia 公司
- (5) HITACHI Himac CR201 型高速冷冻离心机: 日本 HITACHI 公司
- (6) EPPENDORF 5415C 台式高速离心机: 德国 EPPENDORF 公司
- (7) Mini-PROTEAN 2 Cell 电泳装置: 美国 Bio-Rad 公司
- (8) FR-200 型凝胶成像装置, 上海复旦生物技术研究所
- (9) SDJ-超净工作台, 上海淀山湖净化设备厂产品
- (10) AB1377 型 DNA 自动序列分析仪, 美国 PERKIN ELMER 公司产品

## 2 实验方法

### 2.1 结核分支杆菌标准株 H37Rv DNA 的抽提

同第一部分。

### 2.2 KatG 基因的查序:

同第一部分。

### 2.3 PCR 定向诱变与重组

A. 应用 PC Gene 软件所带数据库对 katG 基因序列进行分析, 通过 315 位 (nt943-945) 与 463 (nt1387-1389) 位附近的单一酶切位点, 进行 PCR 定向诱变与重组。

Sorted list of cuts

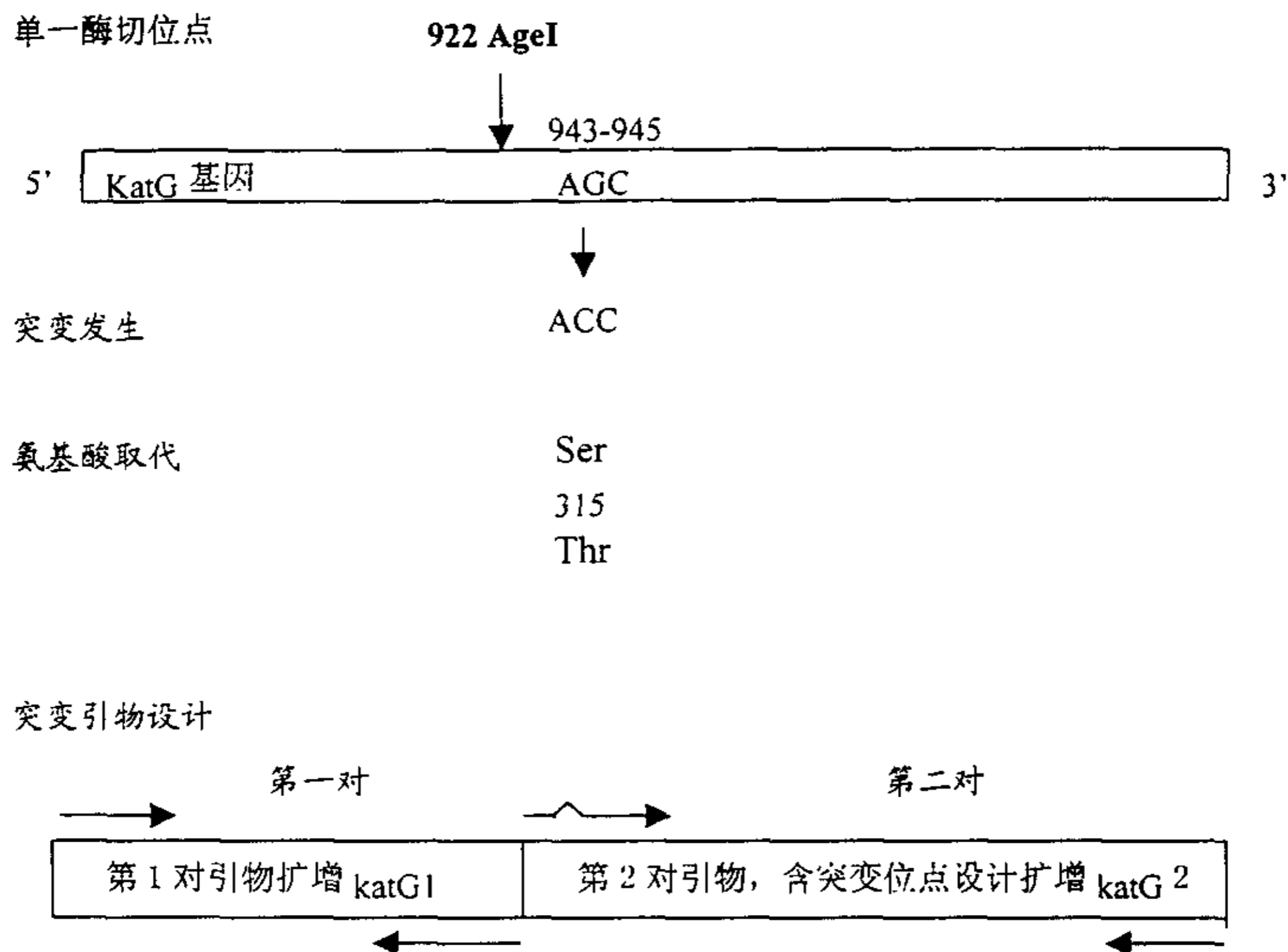
4	AvaI		576	MnlI		1076	HaeII		1589	SecI	
5	SduI		578	HgiJII		1076	BbeI		1591	NspBII	
37	BetI		578	SduI		1076	HpaII		1591	FnuDII	
38	HpaII		607	EcoRII		1078	HgiCI		1591	AciI	
42	NlaIV		607	BssKI		1080	NlaIV		1592	SacII	
44	BsmFI		609	ScrFI		1081	Cfr10I		1592	Fnu4HI	
44	Fnu4HI		609	AeuI		1081	Eco56I		1593	HgiCI	
44	AciI		625	MaeIII		1082	HpaII		1593	KasI	
46	NheI	U	632	AciI		1083	NaeI		1594	AcyI	
47	MaeI	D	632	NspBII		1084	HgiCI		1594	Hin6I	
67	BsiYI		639	AciI		1086	NlaIV		1594	NarI	
67	BsiYI		639	AciI		1086	NlaIV		1594	NarI	
74	NdeI	U	642	XhoII		1091	BssKI		1595	NlaIV	
84	MnlI		642	MboI		1093	ScrFI		1595	Eco78I	
362	NarI		838	HpaII		1363	MwoI		1999	BssKI	
363	Eco78I		838	ScrFI		1372	AflIII	U	2000	SecI	
363	NlaIV		839	CfrI		1373	MseI	D	2001	ScrFI	
364	BssKI		839	XmaIII		1376	MwoI		2001	AeuI	
430	Hin6I		922	AgeI	U	1467	Fnu4HI		2084	SexAI	U
448	HpaII		970	BcgI	D	1495	SfeI	U	2134	KasI	
462	Csp6I		996	BinI		1496	SfaNI		2134	HgiCI	
520	HinfI		1044	MboII		1559	Ksp632I		2177	Fnu4HI	
523	ClaI	U	1046	Hin6I		1559	BssKI		2179	EcoRII	
523	TaqI		1048	HhaI		1561	ScrFI		2179	BssKI	
564	HindII		1075	SgrAI	U	1584	PleI	D			
567	BsrI	D	1075	HhaI		1589	AciI				
575	NlaIV		1075	Cfr10I		1589	DsaI				

U: Unique restriction site for this enzyme (on the complete sequence).

D: Enzyme with two restriction sites (on the complete sequence).

## B. 315 位定向诱变与重组的策略

### ● 定向诱变



根据基因文库所提供的结核分支杆菌 KatG 基因序列, 在 Ser315 对应的核苷酸密码子 (AGC) 上游之核苷酸 922 位有一 AgeI 单酶切位点, 可以该酶切位点为基准, 设计两套引物, 其中第二对即含突变引物 (含 AGC → ACC)。两对引物分别为:

#### 第一对

Primer A 5' — AGTTCATCTAGAGTGCCCGAGCAACACCCACC—3'

酶切位点 XbaI

Primer B 5' — TCCTTACCGGTTCCGGTGCCATAC—3'

酶切位点 AgeI

引物 A 的 5' 端设计了 XbaI 酶切位点, 紧跟酶切位点后即为 katG 的起始密码子。

第二对

Primer C 5'- ACGTCGAAGCTTGCCGACGTCGAACCTGTCGAG 3'

酶切位点 HindIII

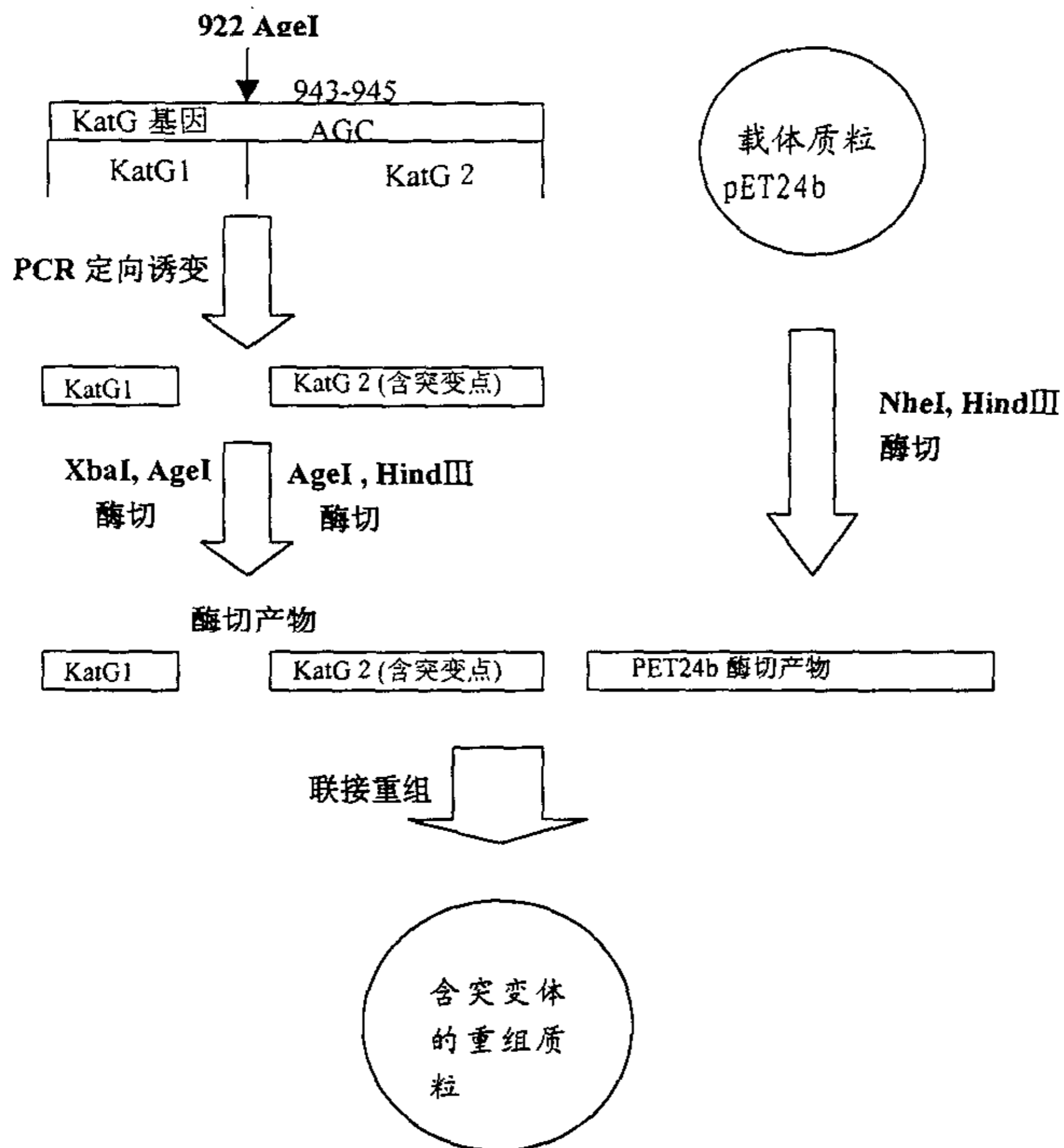
Primer D 5'- CACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCACCGGCATCGAG-3'

酶切位点 AgeI ↑

突变引物设计位置 AGC

引物 C 的 5' 端设计了 HindIII 酶切位点。因考虑到今后在表达 katG 蛋白时需挂上 6 个组氨酸以利于依靠镍亲和柱来纯化蛋白，故避开终止密码子 TGA 来设计引物。引物 D 即含有突变点 ACC。

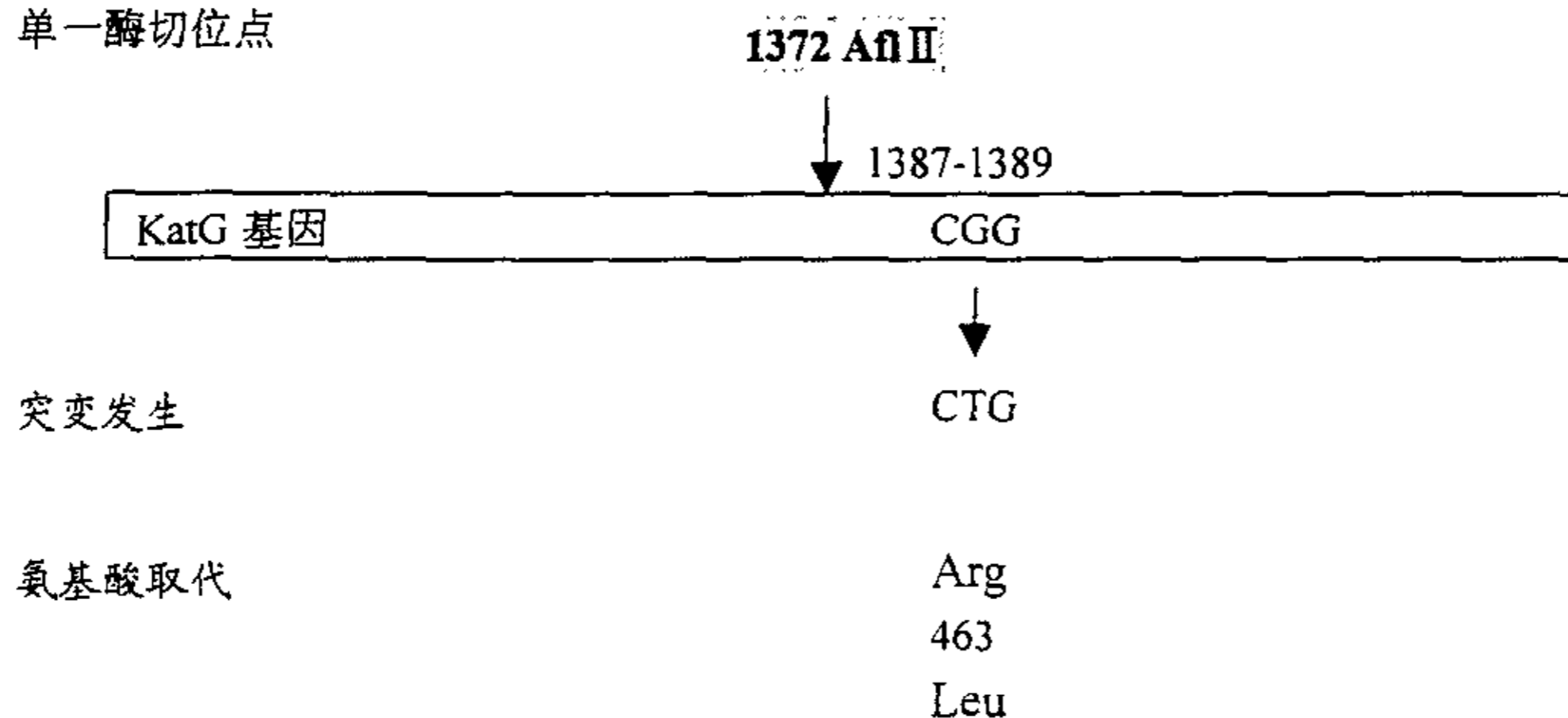
● 重组



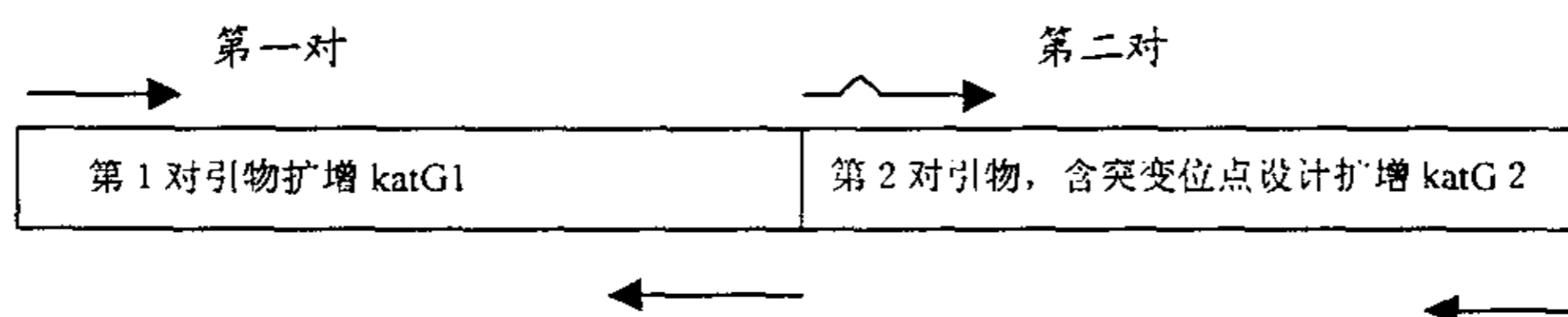
## C. 463 位定向诱变与重组

### ● 定向诱变

单一酶切位点



突变引物设计



根据基因文库所提供的结核分支杆菌 KatG 基因序列, 在 Arg463 对应的核苷酸密码子 (CGG) 上游之核苷酸 1372 位有一 AflII 单酶切位点, 可以该酶切位点为基准, 设计两套引物, 其中一套即为突变引物 (含 CGG→CTG)。两对引物分别为:

第一对

Primer 1 5' \_ AGTTCATCTAGAGTGCCCGAGCAACACCCACC-3'

酶切位点

XbaI

Primer 2 5' \_TGGCTCTTAAGGCTGGCA-3'

酶切位点

AflII

引物 A 的 5' 端设计了 XbaI 酶切位点, 紧跟酶切位点后即为 katG 的起始密码子。



第二对

Primer 3 5' - ACGTCGAAGCTTGGCGCACGTCGAACCTGTCGAG 3'

酶切位点 Hind III

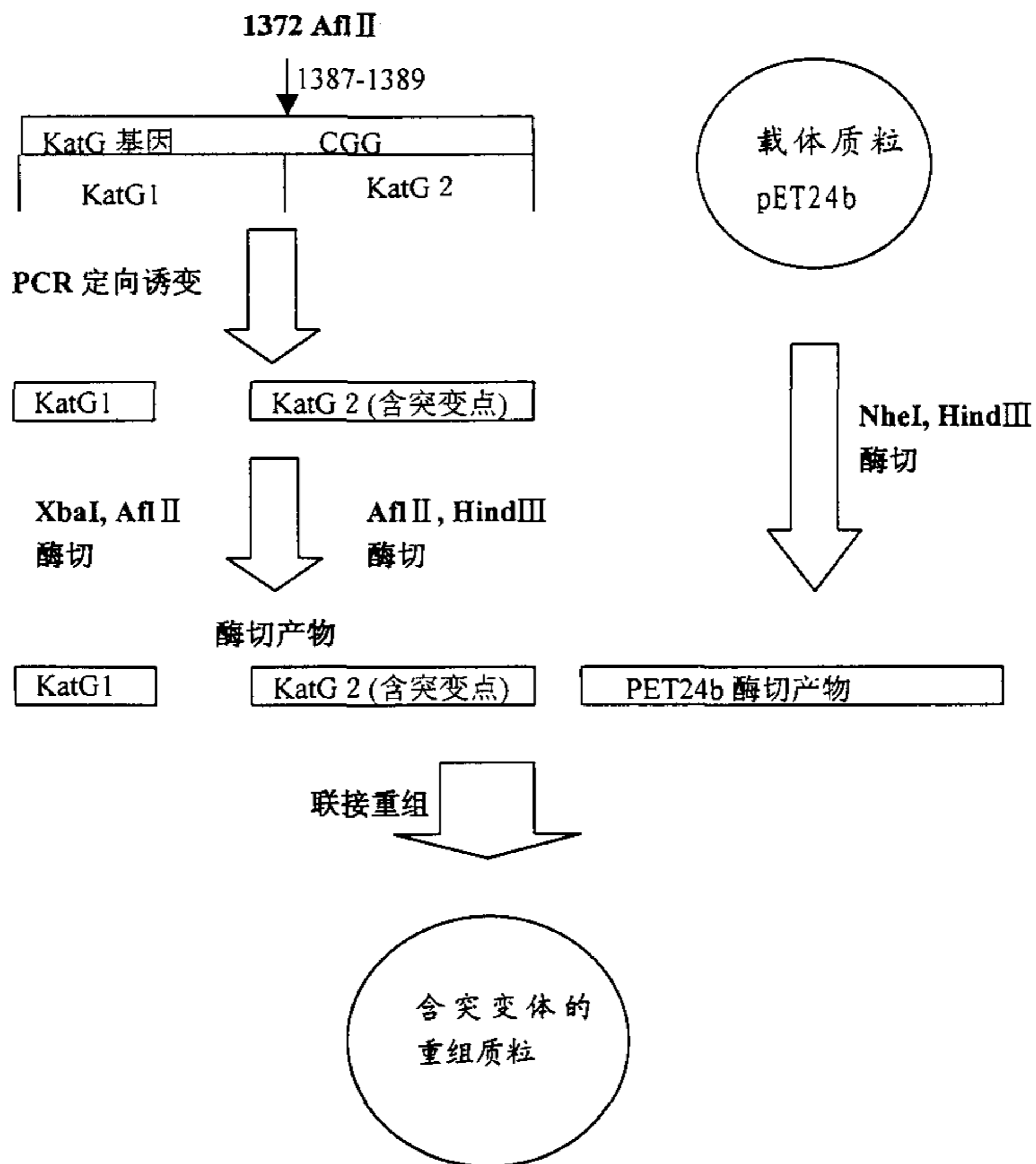
Primer 4 5' - TGCCAGCCTTAAGAGCCAGATC CTGCCCATCGGGATT -3'

酶切位点 Afl III ↑

突变引物设计位置 G

引物 3 的 5' 端设计了 Hind III 酶切位点。因考虑到今后在表达 katG 蛋白时需挂上 6 个组氨酸以利于依靠镍亲和柱来纯化蛋白，故避开终止密码子 TGA 来设计引物。引物 4 即含有突变点 CTG (CGG → CTG)。

● 重组



#### D. 定向诱变 PCR

##### ● 引物合成:

引物由 Sangon 生物工程公司合成。合成后稀释成终浓度 25pmol/ $\mu$ l, 分装,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。从结核分支杆菌标准株 H37Rv 提取的染色体 DNA 作为 PCR 扩增的模板,

##### ● 315 位定向诱变扩增反应体系体系

katG1:

10 $\times$ PCR Buffer	5 $\mu$ l
50 $\times$ dNTP (10mmol/L each)	1 $\mu$ l
primer A	1 $\mu$ l
primer B	1 $\mu$ l
模板 (H37Rv DNA)	1 $\mu$ l (<1ng)
Milli-Q 水	40.5 $\mu$ l
PWO DNA Polymerase	0.5 $\mu$ l (2.5U)
Total Volume	50 $\mu$ l

KatG2:

10 $\times$ PCR Buffer	5 $\mu$ l
50 $\times$ dNTP (10mmol/L each)	1 $\mu$ l
primer C	1 $\mu$ l
primer D	1 $\mu$ l
模板 (H37Rv DNA)	1 $\mu$ l (<1ng)
Milli-Q 水	40.5 $\mu$ l
PWO DNA Polymerase	0.5 $\mu$ l (2.5U)
Total Volume	50 $\mu$ l

### 463 位定向诱变扩增反应体系

katG1:

10 <sub>x</sub> PCR Buffer	5 $\mu$ l
50 <sub>x</sub> dNTP (10mmol/L each)	1 $\mu$ l
primer 1	1 $\mu$ l
primer 2	1 $\mu$ l
模板 (H37Rv DNA)	1 $\mu$ l (<1ng)
Milli-Q 水	40.5 $\mu$ l
PWO DNA Polymerase	0.5 $\mu$ l (2.5U)
<hr/>	
Total Volume	50 $\mu$ l

KatG2:

10 <sub>x</sub> PCR Buffer	5 $\mu$ l
50 <sub>x</sub> dNTP (10mmol/L each)	1 $\mu$ l
primer 3	1 $\mu$ l
primer 4	1 $\mu$ l
模板 (H37Rv DNA)	1 $\mu$ l (<1ng)
Milli-Q 水	40.5 $\mu$ l
PWO DNA Polymerase	0.5 $\mu$ l (2.5U)
<hr/>	
Total Volume	50 $\mu$ l

混匀后, 短暂离心收集液滴至管底。在 GeneAmp9600 PCR 仪上按下  
列方法扩增:

- 95 $^{\circ}$ C 4min
  - 35 cycles: 95 $^{\circ}$ C 1min; 55 $^{\circ}$ C 1min; 72 $^{\circ}$ C 2min; 72 $^{\circ}$ C 5min
- 取适量 PCR 产物用 0.7% 的 Agrose 电泳检测 PCR 结果。

### E. PCR 产物的纯化、酶切及割胶回收

用 QIAGEN PCR Purification Kit (QIAGEN) 纯化 PCR 产物, 方法按试剂盒说明书进行。

### F. 质粒与 PCR 产物的酶切

● pET-24b 酶切体系 (以下内切酶浓度为 20u/ $\mu$ l)

10 $\times$ 酶切 buffer	20 $\mu$ l
pET-24b	20 $\mu$ l
NheI	3 $\mu$ l
HindIII	2 $\mu$ l
BamHI	2 $\mu$ l
MilliQ H <sub>2</sub> O	153 $\mu$ l

条件: 37 $^{\circ}$ C, 1h。

● PCR 产物酶切体系

315 位定向诱变 PCR 产物

[katG1]

10 $\times$ 酶切 buffer	10 $\mu$ l
katG1	20 $\mu$ l
XbaI	3 $\mu$ l
AgeI	3 $\mu$ l
MilliQ H <sub>2</sub> O	64 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l

[KatG2]

10 $\times$ 酶切 buffer	10 $\mu$ l
katG2	20 $\mu$ l
HindIII	3 $\mu$ l
AgeI	3 $\mu$ l
MilliQ H <sub>2</sub> O	64 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l

- 酶切: 37℃水浴 1 小时后, 取上述两个样品的酶切反应液各 5 $\mu$ l, 进行琼脂糖凝胶电泳, 观察酶切反应, 如酶切结果满意则将反应液以 PCR 纯化试剂盒回收酶切产物, 终体积为 20 $\mu$ l。

#### G. 目标基因与载体的连接

- 连接体系

连接 buffer	5 $\mu$ l
pET-24b 酶切产物	5 $\mu$ l
katG1 PCR 产物的酶切产物	20 $\mu$ l
katG 2 PCR 产物的酶切产物	20 $\mu$ l
T4DNA 连接酶	1 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

- 连接: 将以上连接体系混匀, 置 12-18℃水浴中过夜。转化用。

#### (4) 重组质粒的筛选与鉴定

##### A. 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态的制备:

过夜 DH5 $\alpha$  菌 1ml 转接于 100ml LB 中, 37℃摇床—200 转/min 摇 1.5 小时, 分装于 4 只离心管中, 5000g 离心 5min, 弃上清, 振荡沉淀, 每管加预冷 0.1M CaCl<sub>2</sub> 10mL。0℃冰浴 0.5h。再 5000g 离心 5min, 弃上清, 每管加预冷 0.1M CaCl<sub>2</sub> 0.5mL, 用手轻摇匀, 4 管并 1 管, 0℃冰浴>2h, 待用。

##### B. 克隆质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$

将以上感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  轻摇, 分装于 3 只 eppendorf 管中, 每管 200 $\mu$ l, 分别为阴性对照管, 不加质粒; 阳性对照管, 加 2 $\mu$ lpET24b 质粒; 加连接产物 8 $\mu$ l。冰浴 40min, 37℃5min, 再冰浴超过 2h。每管加 0.8LB 培养基, 37℃水浴 30min, 涂布于含卡那霉素的 LB 培养皿上。

### C. PCR 方法筛选阳性克隆

#### 2) 按如下方案制备 PCR 混和物

10×PCR 缓冲液	2 μL
10×dNTP (0.6mmol/L 每份)	2 μL
引物 A (20pmol/μL)	0.2 μL
引物 B (20pmol/μL)	0.2 μL
Tag 聚合酶 (5 单位/μL)	0.1 μL
ddH <sub>2</sub> O	加至 20 μL

2) 用一新牙签挑取一独立噬菌斑, 接种于 20 μL PCR 反应混和液种. 按克隆 KatG 所用的 PCR 条件扩增. 将扩增产物取出 10 μL 于琼脂糖凝胶电泳上分析, 将有阳性扩增产物的克隆作酶切鉴定.

### D. 酶切鉴定阳性克隆

挑选 PCR 产物阳性的单个菌落, 转接 2ml LB 培养基, 按常规抽提质粒. 由于在克隆是 PCR 产物用 XbaI 和 HindIII 处理, 而载体用 NheI 和 HindIII 处理, 处理后连接产生的重组体不能再被 NheI 或 XbaI 酶解, 而位于 katG 核苷酸序列 5' 端第 74 个 bp 位置有单一 NdeI 酶切位点, 经 NdeI 酶切对 katG 片段长度影响不足 4%, 故可以 NdeI 与 HindIII 对重组体进行双酶切鉴定, 以 NdeI 与 HindIII 双酶切鉴定重组质粒. 酶切方法同上. 挑选阳性克隆质粒, 按常规扩增后转化感受态表达载体工程菌 (大肠杆菌 BL 21 (DE3)).

E. 直接测序验证阳性克隆的诱变结果: 由复旦大学遗传研究所测定, 测序仪为 ABI377 自动测序仪.

### 2.4 转化表达用工程菌 [大肠杆菌 BL 21 (DE3)]

大肠杆菌 BL 21 (DE3) 感受态的制作同上. 取扩增后的阳性克隆质粒转化感受态大肠杆菌 BL 21 (DE3).

### 2.5 KatG 基因的表达

A. 诱导 将转化有 pET24b-katG 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株涂于含卡那霉素的 LB 平板上, 30℃ 过夜培养. 挑取抗卡那霉素的菌株接种于 20ml 的 LB 培养基 (加入 20% 的葡萄糖 0.2ml, 浓度 50mg/ml

的卡那霉素 400 μg/ml, 浓度 20mg/ml 的氯霉素 34 μg/ml) 中, 37°C, 160r/min 振摇过夜。取 3ml 过夜培养物种入 100ml 的 LB 培养基 (含 20% 的葡萄糖 1ml, 浓度 10mg/ml 的卡那霉素 400 μg/ml) 中, 37°C 以 160r/min 振摇, 每 20 分钟测定一次  $A_{600}$  值, 直至  $A_{600}$  值到达 0.4~0.5 (勿超过 0.5)。随后每 100ml LB 培养基中加入 1mol/L IPTG 400 μg/ml, 在加入 IPTG 后的第 3 小时收集菌液。将菌液在 4°C 下, 5 000g, 离心 5 分钟, 弃上清。将沉淀物以 10ml 缓冲液 (50mmol/L Tris·Cl, pH 8.0, 2mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100) 重新悬浮, 加入溶菌酶 (100 g/mL)。在冰浴中以中等强度超声破菌, 每次 10 秒, 共 3 次, 破菌后, 4°C, 离心 5 分钟, 收集上清液备用。

**B. 表达产物的 SDS-PAGE 检测** 进行常规蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。收集 IPTG 诱导后的菌液 10 μl, 与加样液 10 μl 混合, 100°C 水浴, 3 分钟后点样, 25mA 恒流通电进行 SDS-PAGE。电泳后以考马斯亮蓝染色 15 分钟, 然后以脱色液脱色观察结果。并对对染色的凝胶扫描以检测目的蛋白的表达水平。

## 2.6 katG 蛋白的纯化

将收集的菌体按 1g 菌用 10mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1mmol/L EDTA 溶液悬浮, 超声破菌, 12,000rpm 离心 15min, 收集上清; 上清液于 95°C 热变性 6 分钟, 14,000rpm 离心 15min, 去除变性杂蛋白, 收集上清; 将热变性上清用 1mol/L 冰醋酸调节 pH 到 5.0, 采用镍亲和纯化柱对表达蛋白进行纯化, 以 50-500mmol/L 咪唑洗脱液梯度连续洗脱分管收集, SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯度; 合并较纯的几管蛋白, 用硫酸铵沉淀备用。

## 2.7 基因产物过氧化氢酶活性测定

- 240nm 吸光度检测: 同第一部分。
- 目测法: 同第一部分

## 结果

### 1. 定向诱变克隆 S315T 以及 R463L

以核苷酸序列第 922 位的 AgeI 酶切位点为界，分别扩增相应部分的 katG 基因，katG2 片段中含有突变位点（拟将 nt944 的 G 诱变为 C）。

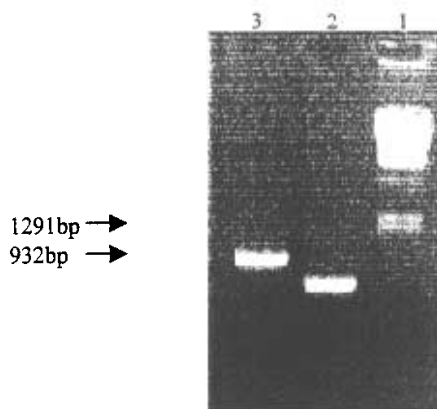


图 1 定向诱变 S315TPCR 反应产物 katG1 与 katG2 (诱变区) 片段

1.  $\lambda$ /HindIII marker
2. KatG1 PCR (1-932) 产物
3. KatG2 (915-2223) PCR 产物 (含 S315 突变点)

3

### 2. R 463T 的 PCR 结果:

#### 2.1 割胶前: katG1 与 katG2

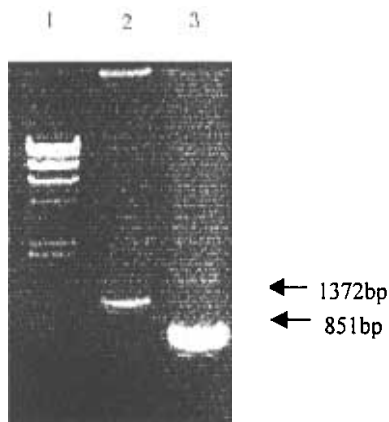


图 2 定向诱变 R463L PCR 反应产物 katG1 与 katG2 (诱变区) 片段

1.  $\lambda$ /HindIII marker
2. KatG1 PCR (1-1372) 产物
3. KatG2 (1372-2223) PCR 产物 (含 R463L 突变点)



## 2.2 割胶后

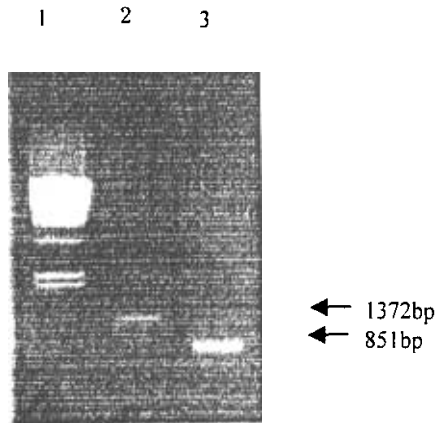


图3 定向诱变 R463L PCR 反应产物 katG1 与 katG2 (诱变区) 片段

1.  $\lambda$ /HindIII marker
2. KatG1 PCR (1-1372) 产物
3. KatG2 (1372-2223) PCR 产物 (含 R463L 突变点)

## 3. 阳性克隆筛选图谱

在抗性培养基中生长的菌落，经培养后抽提质粒，可见克隆有 katG 基因的质粒明显增大，在电泳中的速度显著慢于空载体。



图4. 阳性克隆筛选图谱

- 1:  $\lambda$ /HindIII marker
- 2: pET;
- 3: pET-KatG(S315T);
- 4: pET-KatG(R463L);

#### 4. 阳性克隆的筛选与鉴定

##### 4.1 PCR 法筛选阳性克隆

将克隆的菌株进行 PCR 扩增，结果发现大部分克隆菌株的扩增产物为阳性，即以 KatG 基因的引物可扩增出相应大小的 DNA 片段，大小约 2.2kb，将阳性克隆进一步进行酶切鉴定。

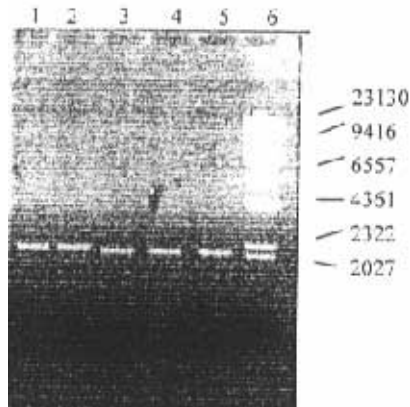


图 5 阳性克隆的 PCR 产物

1-5. PCR 产物; 6.  $\lambda$ /HindIII marker

##### 4.2 克隆质粒的酶切鉴定图谱

质粒经 NdeI 与 HindIII 双酶切产生的 2.2kb DNA 插入片段与 5.3kb 的载体 DNA 片段与预期的结果一致。

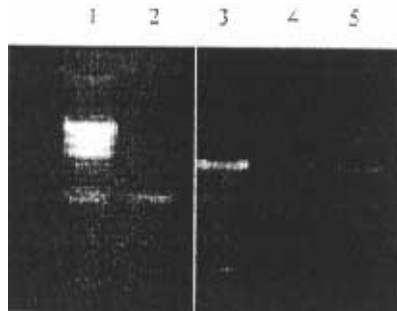


图 6 克隆质粒的酶切鉴定图谱

1.  $\lambda$ /HindIII marker 2: KatG(H37Rv) PCR 产物; 3pET24b/NdeI and HindIII  
3: pET-KatG(S315T) /NdeI and HindIII; 5. pET-KatG(R463L); /NdeI and HindIII;

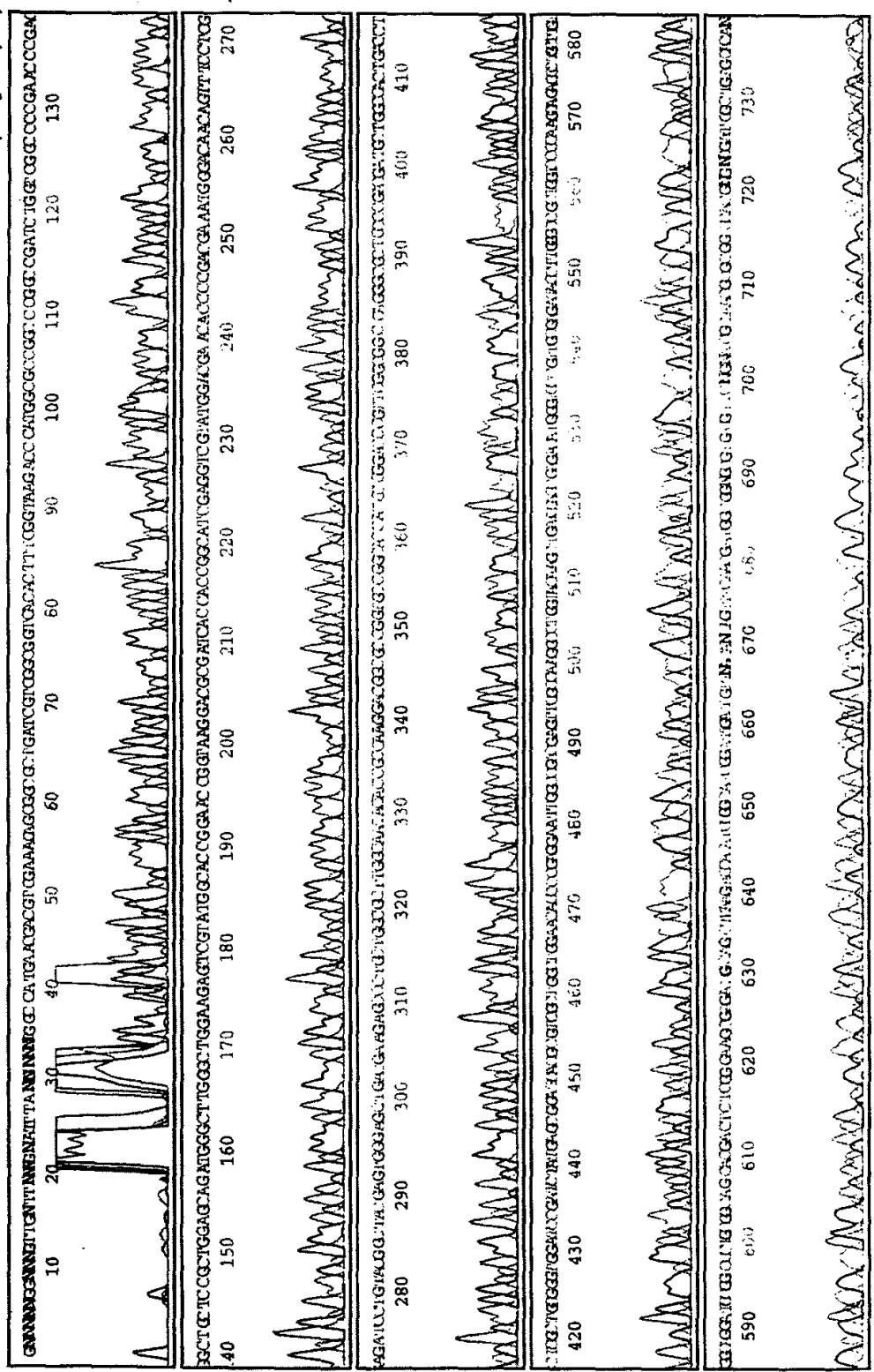


Model 377  
Version 3.0  
ABI1100  
Version 3.0

18-h  
Lane 18

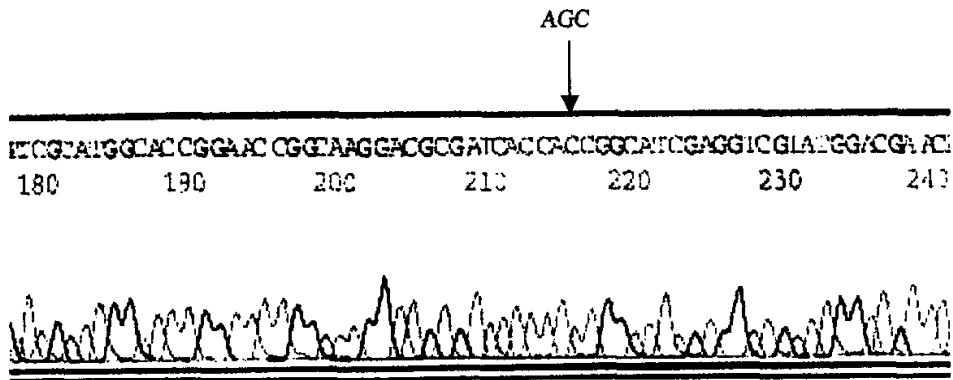
Signal G:320 A:318 T:284 C:517  
DT (BD Set Any-Primer)  
dRMalk6%LR 3/3/98  
Points 655 to 7828 Base 1: 655

Page 1 of 2  
Thu, Jan 6, 2000 9:07 AM  
Wed, Jan 5, 2000 12:31 PM  
Spacing: 8.41(8.41)



5. 直接测序法对突变位点的验证

所测定的序列证明野生型 katG 核苷酸序列之 944 的 G 已经被 C 取代。定向诱变得到证实。



#### 野生标准株 katG 基因相应片段

在 KatG 基因上的位置 → 943-945 959

正常 katG 基因对应序列 → GGTAAGGACGCGATCACCCGGGCATCGAGGTCGTATGGACGAAC

在测序结果上的位置 → (200)            (210)            (220)            (230)            (240)

#### 6. S315T 与 R463 定向诱变株 katG 的表达

分别将含有 katG (S315T) 与 katG (R463L) 基因的 pET24b-katG 表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，在 IPTG 诱导下表达，对表达产物进行 SDS-PAGE 以及考马斯亮蓝染色，将诱导后细菌和诱导前细菌作比较，诱导后细菌裂解液在 Mr 80Kda 处见一浓集的条带。与预计的蛋白质分子量大小一致。

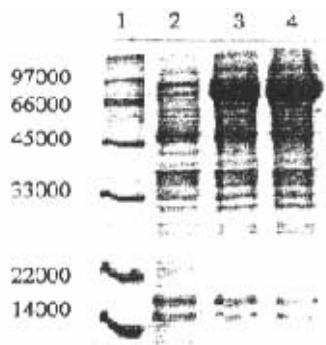


图 7 S315T 与 R463 定向诱变株 katG 基因表达产物的 SDS-PAGE

1. 蛋白分子量标准; 2. 对照; 3. S315T 定向诱变株 katG 蛋白; 4. R463L 定向诱变株 katG 蛋白;

## 7. S315T 与 R463 定向诱变株 katG 蛋白的纯化

### 7.1 洗脱过程

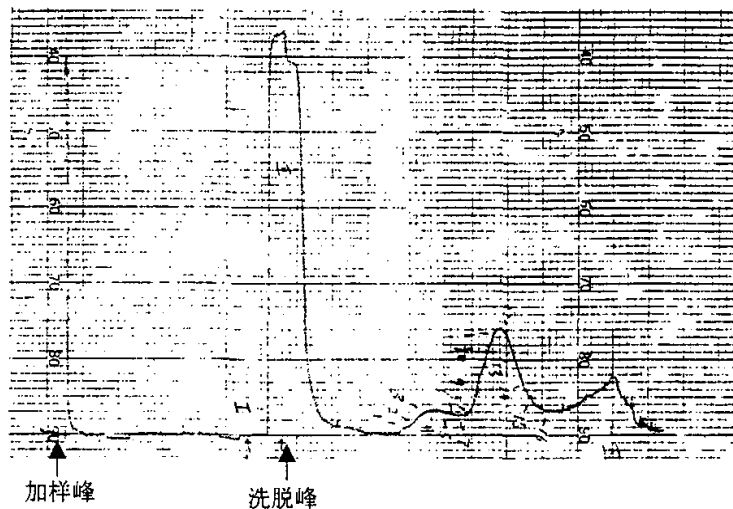


图 8 katG 突变体蛋白的纯化: 咪唑连续梯度洗脱图

### 7.2 katG 蛋白纯化结果

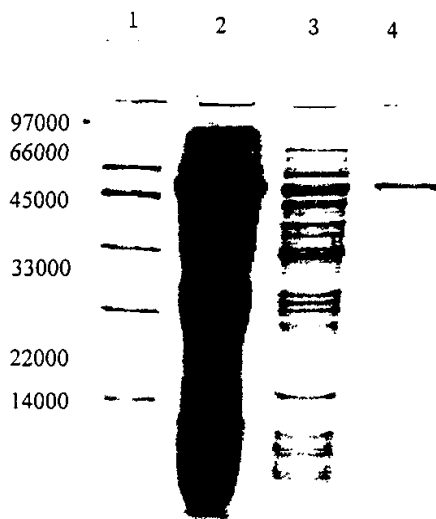


图 9 7.2 katG 蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 分析

1: 蛋白分子量标准; 2. pET24b-katG 突变体质粒诱导全菌液;  
3: .pET24b-katG 突变体质粒诱导破菌上清; 4: pET24b-katG 突  
变质粒诱导破菌上清经镍亲和柱流出液。

## 8. S315T 定向诱变株 katG 的过氧化氢酶活性

### 8.1 野生型 TB 株 H37Rv 株、 R463L 突变株与 S315T katG 蛋白的过氧化氢酶活性

(1) 在过氧化氢反应系统中加入破菌上清后 5 分钟观察结果如下

菌株	过氧化物酶活性 (A <sub>240nm</sub> )	过氧化物酶活性 (±O <sub>2</sub> )	过氧化物酶活 性(比活性)
对照	-0.042	-	0
H37Rv	-0.078	++	100%
R463L	-0.081	++	108%
S315T	-0.060	+	50%

以 H37Rv 株 (野生株) 为基准, 可以看出 R463L 突变株并未发生过氧化氢酶活性的降低; 而 S315T 突变株的过氧化氢酶活性则显著下降, 约降低一半。

注: 比活性算式: 待测株 A<sub>240nm</sub> - 对照 A<sub>240nm</sub> / H37RvA<sub>240</sub> - 对照 A<sub>240</sub>

在过氧化氢反应系统中分别加入含 pET-katG (H37Rv)、pET-katG (S315T) 表达质粒的菌株破菌上清与含 pET 空载体的菌株破菌上清, 检测 240nm 下的吸光度。过氧化氢酶活性可以 A<sub>240</sub> 的下降程度来反应 (即 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 经分解后含量降低), 结果如图所示, 发现含重组 katG (H37Rv) 的菌株破菌上清的酶活性远高于含 pET 空载体的菌株破菌上清, 而含重组 katG (S315T) 的菌株破菌上清的酶活性介于两者中间, 证实野生型菌株 katG 基因点突变导致 315 位 Ser 突变为 Thr 时导致了过氧化氢酶活性的显著降低, 但并未造成完全缺失。

(2) 突变株与野生株的 katG 蛋白过氧化氢酶活性比较

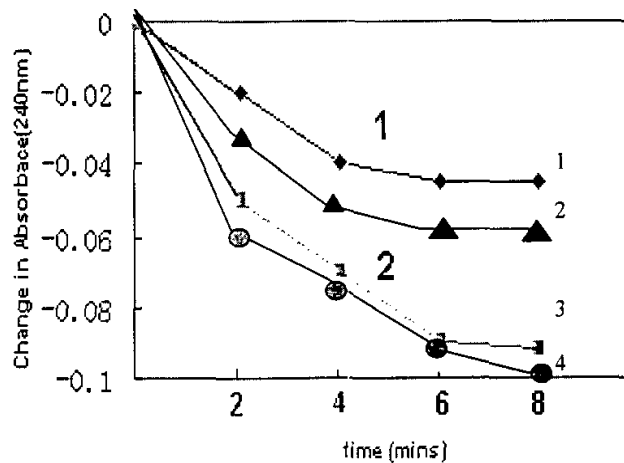


图 10 突变株与野生株的 katG 蛋白过氧化氢酶活性 ( $A_{240nm}$ ) 的比较

- ◆—◆ (1) vector control
- ▲—▲ (2) recombinant vector with KatG (S315T);
- (3) recombinant vector with KatG (WT);
- (4) recombinant vector with KatG (R464L)

## 讨论

结核分支杆菌〔MTB〕耐药性的出现是困惑结核病治疗的主要原因,许多感染了耐药性 MTB 的患者,因缺乏有效的治疗手段而使病情加重甚至死亡。异烟肼 (INH) 是抗结核治疗中最主要的药物之一,是多种药物联合化疗治疗结核病最基本的组成部分。MTB 对 INH 的耐药性问题备受关注,揭示抗结核药物耐药的机制,创建一种对临床分离菌进行耐药性快速检测的有效手段,是目前迫切需要解决的问题<sup>[9]</sup>,随着分子生物学技术的不断发展,新近几年用于 MTB 耐药基因检测的方法日趋成熟,为从分子水平上探明 MTB 的耐药机制奠定了基础<sup>[10]</sup>。近年来众多学者的研究发现:即使在 INH 耐药菌株中,绝大部分都存在 KatG 基因的表达, KatG 基因的完全缺失仅占 INH 耐药菌株的 7% - 21%<sup>[11]</sup>。早年, Zhang 等将 KatG 基因的功能性拷贝导入 2 株 INH 耐药菌中,使之恢复了对 INH 的敏感性,经 DNA 探针杂交,这 2 株菌均呈阳性反应,但无过氧化氢酶的表达,说明其 KatG 基因中存在点突变<sup>[12]</sup>。次年, Altamirano 等的研究第一次提供了 KatG 基因点突变、插入和缺失的直接证据。在他们研究的 9 株耐药菌中,仅 1 株 (11%) 的 KatG 基因完全缺失而其余 8 株经 DNA 测序及 SSCP 分析存在点突变、部分缺失及碱基对插入<sup>[13]</sup>。近年来, DNA 杂交技术、限制性片段长度多态性 (RFLP) WVSR、PCRSSCP 技术、DNA 测序等基因检测技术已广泛用于 KatG 基因及其突变的检测<sup>[14-17]</sup>。结果发现: INH 耐药性结核分支杆菌中, KatG 基因突变较其完全缺失更为普遍。同时,多数的文献都对在异烟肼耐药菌株的 katG 基因中发现 315 位由丝氨酸 (AGC) 突变为苏氨酸 (AGC) 以及 463 位的精氨酸 (CGG) 突变为亮氨酸 (CTG) 作了报道,认为这两个突变点是可以作为检测结核杆菌对异烟肼耐药的简易指标<sup>[3-5]</sup>。但近年来出现对 R463/L 突变点意义的异议,美国与新加坡有多人证实在相当部分的敏感菌株中发现有 R463L 的变异<sup>[6,7]</sup>。因此,结核分支杆菌的 INH 耐药性相当复杂,目前声称哪些位点作为检测耐药的基本突变点还为时过早。重要的是必须对目前检出的突变点作出评估,对于确信有意义的位点才能作为临床检测的依据。

本部分的研究是国内首次用定点诱变的技术克隆了 katG 基因的两个常见突变体 (R463L 与 S315T),在此基础上研究突变体基因功能的改变,由此直接分析两个突变点在耐药机制中的意义。

定向诱变技术是 Mullis K 等人于 1986 年首创的技术,通过引物



的人为改变对扩增产物进行修饰，再利用载体质粒在大肠杆菌中完成重组而获得突变体<sup>[18]</sup>。在诱变过程中，本研究应用了高保真的 PWO DNA 聚合酶，以防止随机突变的发生。由于所要诱变的位点位于 katG 序列中心的功能区，故在克隆时必须进行 2 次扩增，其中一个扩增产物即包含了突变点，再利用重组技术将所需基因进行完整的重组。获得突变子后，在有条件的前提下最好对突变区进行测序验证。

在获得可靠的突变体后，将之转化到高表达的载体 pET24b 中，在大肠杆菌中实现高表达。本研究发现突变体的 katG 基因表达量与野生株接近，由此可以认为 katG 基因突变引起耐药可能不是通过基因表达量的下降，而可能是本身基因功能受到影响所致。

通过进一步对突变体的过氧化氢酶的活性检测发现，S315T 位的突变导致过氧化氢酶活性较野生株显著下降（约降低 50% 左右），提示该密码子突变与 katG 功能改变造成过氧化氢酶活性降低密切相关，而且酶活性降低程度与文献报道的临床突变株对异烟肼的 MIC 值的上升程度相一致<sup>[19]</sup>，说明 katG 基因表达产物的酶活性与异烟肼耐药性可能还存在酶活依赖关系。R463L 突变体的情况有所不同，该位点的突变并未带来 katG 的过氧化氢酶活性降低。463 密码子未对过氧化氢酶的活性造成影响。兼之目前在临床敏感菌株中不断发现有该位点的突变<sup>[6,7]</sup>，可以初步判断该位点的突变仅仅是耐药菌株的一个多样性结构，本身可能不会引起耐药。

综上所述，结核分支杆菌的 INH 耐药性是相当复杂的，迄今为止的大量研究还不能对此作出完全解释，尚有许多域需要进一步探索。今后的研究，可能既要着重对这些 INH 耐药基因作进一步的 DNA 序列分析，以明确其突变位点、突变类型及发生频率，同时也需对这些突变点的意义作慎重的评估。特别是在临床耐药菌株中可能会筛选出一批突变体，但是否这些突变都有意义呢？如果草率地将临床耐药菌株中发现的突变体作为分子生物学检测耐药菌株的指标的话可能会对临床有效治疗结核感染带来巨大损失。当前基因诊断技术日新月异，这是今后临床检测耐药菌株的福音，但若要将这些技术应用于临床则归根结底还需作大量的基础性工作，才能真正为结核病的快速诊断和有效控制开辟广阔的前景。

### 小结

- 本研究成功地以定点诱变的技术克隆了 katG 基因的两个常见突变体(R463L 与 S315T)，并以直接测序对诱变结果作了初步验证。填补了国内缺乏结核耐药机制研究中直接评价突变体意义的空白。
- 通过对突变体的过氧化氢酶的活性检测发现，S315T 位的突变导致过氧化氢酶活性较野生株显著下降(约降低 50%左右)，提示该密码子突变与 katG 功能改变造成过氧化氢酶活性降低密切相关
- R463L 突变体并未带来 katG 的过氧化氢酶活性降低，认为该位点突变通过降低过氧化氢酶活性造成结核杆菌对异烟肼耐药的依据不足

## 参考文献

1. Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of mycobacterium tuberculosis. *Nature*, 1992, 358:591.
2. Rouse DA, De Vito JA, Li ZM, et al. Site-directed mutagenesis of the katG gene of Mycobacterium tuberculosis: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol*, 1996; 22 (3): 583
3. 张宗德, 马与, 程绍基, 等。异烟肼耐药与结核分支杆菌 katA 基因突变的研究。中华结核和呼吸杂志 1996, 19: 346 - 349。
4. Pretorius GS, van-Helden PD, Sireg F, et al. Mutations in KatG gene sequences in isoniazid resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis are rare. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39:2276.
5. Cockerill FR 3<sup>rd</sup>, Uhl JE, Temesgen Z, et al. Rapid identification of a point mutation of the mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase(katG) gene associated with isoniazid resistance. *J Infect Dis*, 1995, 171:240-245.
6. Rouse DA, Devito JA, Li Z, et al. Site-directed mutagenesis of the katG gene of mycobacterium tuberculosis: effects on Catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol*. 1996,22:583.
7. Shim TS, Yoo CG, Han SK, et al. Isoniazid resistance and the point mutation of codon 463 of katG gene of Mycobacterium tuberculosis. *J Korean Med Sci*, 1997, 12:92.
8. Li Z, Kelley C, Collins F, et al. Expression of katG in Mycobacterium tuberculosis is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *JID* 1998;177:1030
9. Neville K, Bromberg A, Bromberg R, et al. The third epidemic multidrug-resistant tuberculosis. *Chest*, 1994, 105:45.
10. 吴雪琼, 庄玉辉, 张晓刚, 等, 结核分枝杆菌耐异烟肼分子机制的研究。中国防痨杂志, 1998; 20 (1) : 35
11. Zhang Y, Young DB. Molecular mechanisms of isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends Microbiol*, 1993, 110:109.
12. Zhang Y. Strain variation in the katG region of mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* 1994;14:301

13. Altamirano M, Smith JA. Mutations in catalase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis*, 1994;169:1162.
14. 吴雪琼, 庄玉辉, 张俊仙, 等. 应用 PCR - SSCP 检测结核分枝杆菌链霉素耐药基因的研究. *中国现代医学杂志*, 7 (3): 12, 1997
15. Meier A, Kirschner P, Bange FC, et al. Genetic alterations in streptomycin resistant *Mycobacterium tuberculosis*: mapping of mutations conferring resistance. *Antimicrob* 1994;38:228
16. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin - resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996;40(4):1024
17. Rossau R, Thore H, Beenhouwer HD, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997;41(10):2093
18. Jones DH, Howard BH. A rapid method for recombination and site-specific mutagenesis by placing homologous ends on DNA using polymerase chain reaction. *Bio Techniques*, 1991;10:62.
19. Wengenack NL, Todorovic S, Yu L, et al. Evidence for differential binding of isoniazid resistant mutant *katG*(S315T). *Biochemistry* 1998;10:15825

### 第三部分

#### katG 突变体的检测与评价

近年来, DNA 杂交技术、限制性片段长度多态性 (RFLP) WWSR、PCR-SSCP 技术、DNA 测序等基因检测技术已广泛用于 KatG 基因及其突变的检测<sup>[1-4]</sup>。结果发现: INH 耐药性结核分支杆菌中, KatG 基因突变较其完全缺失更为普遍<sup>[5]</sup>。但是否所检出的突变点即是引起耐药的原因, 或者说当存在不同突变点的联合突变时, 是其中一个突变点导致耐药呢, 抑或系协同作用所致, 尚不得而知。诚如 KatG 基因的 463 位点上精氨酸-亮氨酸的突变, 可在 44.2% 的耐药菌株中存在, 曾一度认为是导致 INH 耐药的重要突变。国内对 INH 耐药菌株的分子生物学检测也得出了类似的结论<sup>[6]</sup>。但近年来以新加坡研究者首先对此表示质疑, 并声称在敏感菌株中也不断有该突变点的发生。本研究也表示, 含该突变体的基因并未导致 katG 活性的改变<sup>[7]</sup>。

目前随着显性探针杂交以及基因芯片等技术在临床诊断中日益广泛的应用, 基础的工作乃是筛选新的有价值的突变点, 同时对众多已报道的突变点作出评估, 从而为基因芯片等技术的应用奠定基础。

本部分的工作从对 INH 耐药最为重要的 katG 基因着手, 建立有效、低成本的突变点初筛方法——多聚酶链反应-单链构象多态 (single Strand Conformation Polymorphism, PCR-SSCP) 分析法, 作为临床筛选耐药菌株的基础。进而本研究应用电转化转导技术验证 katG 突变子 S315T 转化耻垢分支杆菌后 (*M. Smegmatis*) 对其耐 INH 特性的改变, 从而为建立验证突变子意义的方法进行更深入的探讨。最后结合本研究的第一与第二部分工作 (即 KatG 基因的克隆技术、定点诱变技术) 以及 KatG 基因转导技术提出筛选与评估临床耐药菌株突变体意义的策略。

## 一、单链构象多态性 (SSCP) 技术对临床耐药菌株 katG 基因突变体筛选方法的建立

### 材料与amp;方法

#### 1. 菌株

- 结核分支杆菌野生型 H37Rv 标准株: 由本校客座教授、美国 FDA 分支杆菌实验室李忠明博士提供。
- 临床分离结核分支杆菌: 16 株 INH 耐药及敏感的临床分离株由上海疾病防治中心结核防治科提供, 其中敏感株与耐药株各 8 株。
- 药敏试验: 和改良罗式培养基绝对浓度法的间接法。耐药标准: INH 敏感:  $\leq 0.2 \mu\text{g/ml}$ ; 低度耐药:  $>0.2 \mu\text{g/ml}$ ; 中度耐药:  $>1 \mu\text{g/ml}$ ; 高度耐药:  $> 50 \mu\text{g/ml}$ 。所有耐药菌株均为中度耐药君。具体操作参照结核病诊断细菌学检验规程进行。

#### 2. 主要仪器

- DNA 自动扩增仪: 9600 型。美国 PE 公司
- 水平式电泳槽: 德国 Phamacia 公司
- EPPENDORF 5415C 台式高速离心机: 德国 EPPENDORF 公司
- 垂直电泳装置: 美国 Bio-Rad 公司
- FR-200 型凝胶成像装置, 上海复旦生物技术研制所
- SDJ-超净工作台, 上海淀山湖净化设备厂产品
- 多点接种仪

#### 3. 主要试剂:

- 蛋白酶 K (Proteinase K), 上海华舜公司进口分装)
- 乙二胺四乙酸 (EDTA, 上海化学试剂一厂)
- PWO DNA 聚合酶: 罗氏公司产品
- dNTPs 混合液: Promega 公司产品
- QIAquick PCR purification kit, 德国 QIAGEN 公司产品
- QIAquick Gel extraction kit, 德国 QIAGEN 公司产
- 细菌 DNA 抽提试剂盒: 购自德国 QIAGENE 公司
- 十二烷基硫酸钠: 华舜公司进口分装

- 丙烯酰胺与 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺: SIGMA 公司
- 核酸和蛋白质分子量标准: 购自 Promega 公司
- Tris: 分析纯, 德国 Boehringer Mannheim 公司产品
- 寡聚核苷酸: 由 Sangon 生物工程公司合成
- 溴化乙锭 (EB), Fluck 公司
- 甲酰胺, SIGMA 公司
- 溴酚蓝, 上海化学试剂一厂
- 二甲苯青 FF, SIGMA 公司
- 四甲基乙二胺 (TEMED), 美国 Sigma 公司
- 细菌 DNA 抽提试剂盒: 购自德国 QIAGEN 公司

#### 4. 常用试剂配方

- 30%丙烯酰胺
 

丙烯酰胺	29g
N, N'-亚甲双丙烯酰胺	1g
加水至 1000ml	
将溶液加热至 37℃助溶.	
- 10×TBE (每升)
 

108g Tris 碱
27.5g 硼酸
20ml 0.5mol/L EDTA (pH8.0)
- 10%过硫酸铵: 过硫酸铵 1g, 加水至 10ml, 4℃保存
- 50×TAE: Tris 碱 242g 加 ddH<sub>2</sub>O 600ml 充分溶解, 加冰乙酸 57.1ml、0.5M EDTA (pH=8) 100ml, 定容至 1L, 分装灭菌。电泳时稀释为 1×TAE
- 6×上样缓冲液 (用于 SSCP)
 

称取溴酚蓝 250mg, 加 ddH <sub>2</sub> O 10ml, 室温下过夜
称取二甲苯青 FF 250mg, 加 ddH <sub>2</sub> O 10ml 溶解
称取 40g 蔗糖, 加适量 ddH <sub>2</sub> O 溶解
合并以上三溶液, 定容至 100ml, 置 4℃备用

#### 5. 实验方法

##### 5.1 结核分支杆菌 DNA 的抽提

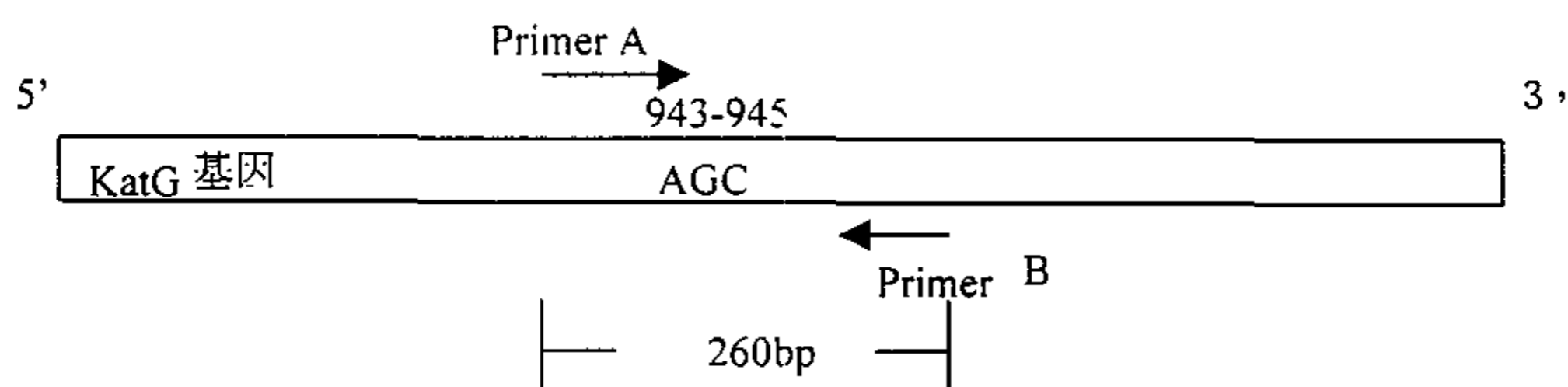
- 将 TB 菌株转种于罗氏培养基上。37℃孵育 3 周, 用生理盐水将

细菌洗下, 80°C, 2 小时灭活培养物;

- 5000g 离心 10 分钟, 收集菌株。在细菌沉淀中加入 200 $\mu$ l 下列溶液- (20mM Tris, PH 8.0; 2mM EDTA; 1.2%Triton X-100; 4mg 溶菌酶), 彻底振荡悬浮;
- 37°C 温育 30 分钟以上。其后按细菌 DNA 抽提试剂盒说明, 加入 250 $\mu$ l 消化液和 25 $\mu$ l 蛋白酶 K, 迅速振荡混匀。置 65°C 温浴 15 分钟;
- 加 350 $\mu$ l 裂解液, 混匀后离心 10 分钟, 收集上清至另一离心管, 加如 10 $\mu$ l RNase 酶, 混匀, 55-65°C 温浴 5 分钟;
- 加入 350 $\mu$ l 无水乙醇, 混匀后取 750 $\mu$ l 样品液至吸附柱上, 离心 15 秒, 再分别以洗涤液洗 2 次, 离心弃收集管中的液体, 最后以 100 $\mu$ l 洗脱液洗脱, 将收集到的 DNA -20°C 保存备用。

## 5.2 PCR 引物设计

- 从 GenBank 获得 KatG 基因序列, 同第一部分. 设计一对引物以扩增含 315 突变位点的 katG 片段:



Primer A: 5'>CACTTTCGGTAAGACCCATGGC<3'

Primer B 5'>TATTGCCAAGCGCCAGCAGG<3'

## 5.3 PCR 反应

[按如下方案制备 PCR 混和物]

模板 (H37Rv DNA)	1 $\mu$ l
10 $\times$ PCR 缓冲液	2 $\mu$ L
10 $\times$ dNTP (0.6mmol/L 每份)	2 $\mu$ L
引物 A (20pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
引物 B (20pmol/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L



PWO DNA 聚合酶 (5 单位/ $\mu\text{L}$ )                      0.1 $\mu\text{L}$   
ddH<sub>2</sub>O                                                              加至 20 $\mu\text{L}$

[条件]

95 $^{\circ}\text{C}$  3min

35 cycles: 95 $^{\circ}\text{C}$  1min, 60 $^{\circ}\text{C}$  1min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1min

72 $^{\circ}\text{C}$  5min

soak at 4 $^{\circ}\text{C}$

用 0.7% 的 Agrose 电泳检测 PCR 结果, 将有阳性扩增产物的克隆作酶切鉴定.

#### 5.4 PCR 产物的 SSCP 分析:

[制胶]

8% 聚丙烯酰胺凝胶配制 (10ml):

30% 丙烯酰胺	2.66ml
ddH <sub>2</sub> O	6.17ml
80% 甘油	100 $\mu\text{l}$ $\mu\text{l}$
10 $\times$ TBE	1 ml
10% 过硫酸铵	70 $\mu\text{l}$
TEMED	15 $\mu\text{l}$

立即混匀后缓慢倒入胶槽中, 直至槽口, 插入梳子, 待胶凝固.

[加样与电泳]

- 取阳性 PCR 产物 10 $\mu\text{l}$ , 加 2 $\mu\text{l}$  上样缓冲液, 混匀
- 95 $^{\circ}\text{C}$  水浴变性 10 分钟,
- 立即冰浴骤冷, 10 分钟
- 取 12 $\mu\text{l}$  上样, 然后进行低温 (4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱内) 进行垂直电泳,
- 电压 200V, 1.5 小时
- 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  EB 染色 30-60 分钟
- 凝胶成像仪下直接观察结果并拍照.

## 结果

### 1. KatG 基因检测

所有 8 株敏感菌均有 KatG 的表达; 在 8 株耐药菌中, 亦均有 KatG 基因表达, 提示未发现完全缺失 KatG 的基因。

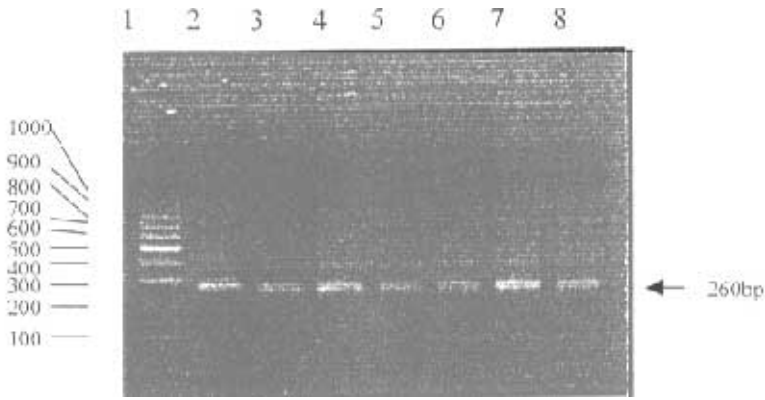


图 1 在临床分离的敏感株中扩增得到的 260bp 的 katG 片段

1. Marker; 2-8, 从对异烟肼敏感菌株中扩增到的 katG 片段

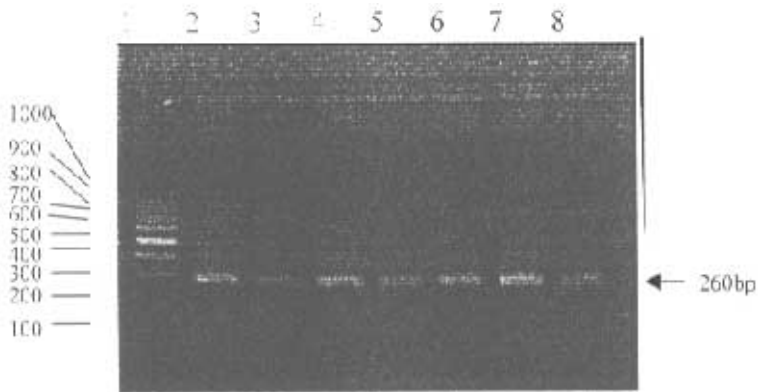


图 2 在临床分离的耐药株中扩增得到的 260bp 的 katG 片段

1. Marker; 2-8. 260bp katG fragment of clinical isolates sensitive to [NH]

## 2. SSCP 分析

以结核分支杆菌标准株 H Rv 作为对照, 对 8 株不同程度的 INH 耐药菌 (MIC1 - >50 g/ml) 及 8 株敏感菌进一步作 SSCP 分析, 发现: 所有 8 株耐药菌中有二株发现单链带泳动异常, 其单链带型与标准株单链带带型不同, 而所有 8 株敏感菌的单链带泳动正常, 其带型与标准单链带带型完全一致, 2 株泳动异常株与标准株及临床分离敏感株电泳结果比较图如下:

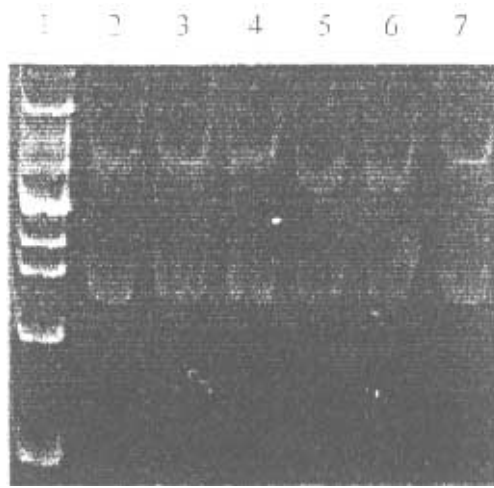


图 3 katG 片段 (nt810-1036) 的 PCR-SSCP 电泳照片

1. 未变性的 DNA marker;
2. 为野生标准株 H37Rv 株;
- 3, 4 为临床分离的敏感株;
- 5, 6 为出现泳动异常的临床耐药株;
7. 为泳动正常的临床耐药株.

## 二、转化了 katG 突变体或野生株株 katG 基因的耻垢分支杆菌对异烟肼的药敏变化测定

### 材料与amp;方法

#### 1. 材料

##### 1.1. 菌株

- 克隆了 S315T katG 的 pET24b 质粒: 本文第二部分获得。
- 对异烟肼高度耐药、katG 基因缺失的耻垢分支杆菌 BH1 (M. Smegmatis BH1): 李忠明博士惠赠

##### 1.2. 主要仪器

- Gene Pulser apparatus: 美国 Bio-Rad 公司
- 克隆技术所需仪器参见本文第一部分
- 超滤灭菌器, 美国 Bio-Rad 公司

##### 1.3. 主要试剂:

- Middlebrook 7H11 琼脂
- 卡那霉素, 上海延安制药厂
- 异烟肼, 上海延安制药厂
- 小牛血清白蛋白组分 V, sigma 公司产品

##### 1.4. 常用试剂配方

- ADC enrichment 配制

葡萄糖	2 g
Nacl	0.85g
ddH <sub>2</sub> O	100ml

以上溶液混合后超滤灭菌

- Middlebrook 7H11 琼脂培养基

Middlebrook 7H11 琼脂	10g
甘油	2.5ml
ADC enrichment	1.6ml
ddH <sub>2</sub> O	500ml

以上溶液混合后超滤灭菌

- 异烟肼与卡那霉素药敏平皿

卡那平皿: 50 g 卡那霉素/ml 培养基

异烟肼平皿: 100 gINH/ml 培养基

## 2. 方法

### 2.1 含 S315T 的 katG 突变体克隆质粒的构建

从本文第二部分的研究——定向诱变法克隆 katG 基因突变体以及对其功能的比较分析中获得, 详细克隆过程见第二部分.

### 2.2 电转化耻垢分支杆菌 (*M. smegmatis*)

(由于缺乏 Gene Pulser apparatus, 故将 S315TkatG 突变体克隆质粒电转化工作交付本课题导师小组成员李忠明博士所在实验室完成, 将转化好的 *M. smegmatis* BH1 菌株带回, 以下电转化过程由课题组李忠明博士提供)

- 将 S315TkatG-pET24b 携带的 S315TkatG 基因转换到质粒 pMD31 上.
- 将质粒 DNA 与感受态细胞混匀, 冰浴一分钟,
- 将电转化仪调到 1.25kV、25mF, 脉冲控制器调到 1000Ω.
- 将转化混合物转移到预冷的电转化池中, 电脉冲 10 秒
- Middlebrook 7H9 液体培养液悬浮转化的细胞, 37℃ 孵育 3 小时
- 将 *M. smegmatis* 转化子转接种于含卡那霉素 (50μg/ml) 的 7H11 琼脂培养基上.
- 以同样方法, 将 pMD31 空质粒以及 pMD31-野生型 katG 基因转化 *M. smegmatis* 作为对照.

### 2.3 *M. smegmatis* 转化子对异烟肼的药敏检测

将以上转化子以及未转化的 *M. smegmatis* 菌株分成 4 组, 分别为未转化组, 转化 pMD31 空载体组, 转化 pMD31-野生型 katG 基因以及 pMD31-S315TkatG 突变体组, 分别以多点接种仪接种于含卡那霉素 (50μg/ml) 或含卡那霉素 (50μg/ml) + 异烟肼 (100μg/ml) 的 Middlebrook 7H11 固体培养基上. 37℃ 孵育 48 小时观察菌株生长情况.

## 结果

37℃孵育 24 小时后, 观察 *M. smegmatis* 菌株生长情况发现, 在单含卡那霉素 (K) 的培养平板上, 所有菌株均生长良好, 而在含卡那霉素与异烟肼 (K+I) 的培养平板上, 仅转化有 pMD31-野生型 *katG* 基因的 *M. smegmatis* 菌株生长良好, 转化 pMD31-S315T*katG* 突变体的 *M. smegmatis* 菌株与转化 pMD31 空载体的菌株未能良好生长. 见下图.

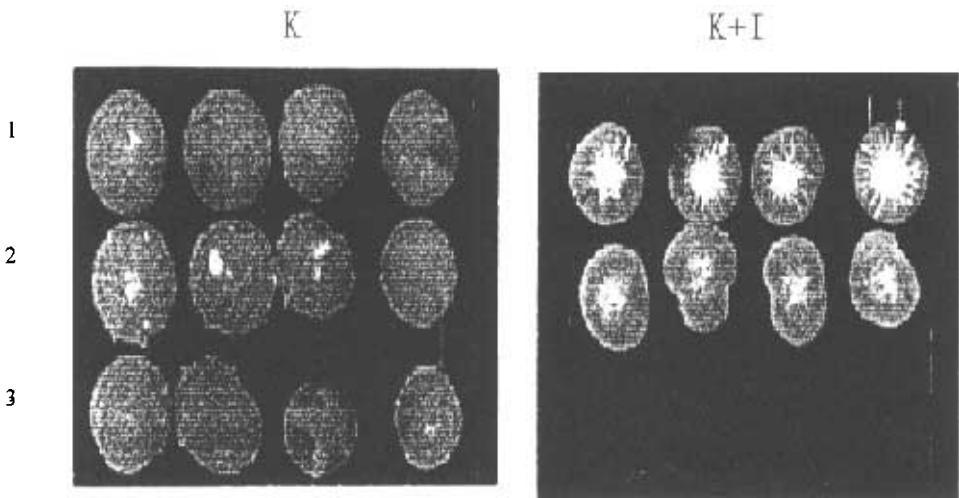


图 4 分别转化了 pMD31(空载体)、pMD31-*katG* 基因 S315T 突变体及 pMD31-野生株 *katG* 的 *M. smegmatis* BH1 菌株在卡那霉素 (K) 或卡那霉素+异烟肼 (K+I) 的培养基上的生长情况

1. 转化 pMD31(空载体)
2. 转化 pMD31-*katG* 基因 S315T 突变体
3. 转化 pMD31-野生株 *katG*

## 讨 论

自 1992 年报道了首例 *katG* 基因缺失的结核分支杆菌对异烟肼高度耐药以来<sup>[8]</sup>, 关于 *katG* 基因与异烟肼耐药性关系的研究虽然国内外已经屡有报道, 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. 而且越来越多的事实证明, 在这些耐药菌株中, 很少发现有 *katG* 基因完全缺失的病例, 对耐药菌株 *katG* 基因的序列分析也证实了这一点<sup>[9]</sup>. 我国目前对 *katG* 基因的分析多集中于 282bp 与 237bp 的热点突变区域, 这些区域的变异可在 2/3 的耐药菌株中观察到<sup>[10]</sup>. 但对于引起耐药的原因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? 就异烟肼耐药机制而言, 与利福平的耐药情形存在显著差异, 前者与耐药相关的基因较多, 包括 *katG*、*ahpc*、*inhA*, 最近又提出 *casA* 可能也是一个耐药相关基因<sup>[11]</sup>, 而利福平耐药相关的基因目前公认的主要只有 *ropB*<sup>[12]</sup>, 而且突变点也相当有限, 国外已经通过线性探针杂交方法 (LiPA) 对临床菌株进行利福平耐药的筛检<sup>[4]</sup>, 而这对于异烟肼耐药检测就不恰当, 因为与之相关的突变点过多, 不适于用探针杂交方法检测. 但这并不表示通过分子生物学技术筛检异烟肼耐药菌株就没有可能性, 目前迅猛发展的基因芯片技术已经着手进行利福平耐药菌株筛检的尝试阶段<sup>[13]</sup>. 而异烟肼耐药由于其耐药机制与相关耐药基因的复杂而位居其次. 因此对目前发现的临床菌株突变点进行筛选与评估是一项基础性的工作, 否则不可能进入临床检测阶段.

本实验中, 我们建立了采用 PCR - SSCP 技术对 8 株不同程度的 INH 耐药菌及 8 株敏感菌作了进一步的检测. PCR-SSCP 是一种 DNA 单链凝胶电泳技术, 它根据形成不同构象的等长 DNA 单链在中性聚丙烯酰胺凝胶中的电泳迁徙率变化来检测基因变异, 该法具有快速、简便、灵敏和适于大样本筛查的特点, 可有效检出碱基置换、缺失、插入等基因<sup>[14]</sup>, 本研究以 *katG* 包含 315 位点的约 260bp 的片段为例, 建立 *katG* 基因点突变的初筛方法, 对于有意义的突变点可进一步予以测序, 并对确切的突变点进行耐药性价值的评估.

本研究对 8 株耐药菌的 *katG* 基因的部分片段 (260bp, 约占总基因长度的 1/9) 进行了 SSCP 筛查, 发现一株存在 sscp 泳动图像异常. 证明在该区域存在点突变. 而其他耐药菌株的耐药机制与该区域无关, 可用其他区段的 sscp 方法进行筛查. 这也从另外一个角度反映了结核杆菌对 INH 得耐药机制相当复杂, 难以以有限的基因位点突变来解释,

如果要开发分子生物学技术对耐药菌株进行检测则必须继续做大量的基础性工作. 本研究对所有菌株的检测中均能扩增到 *katG* 片段, 这充分说明了 *KatG* 基因突变导致过氧化氢酶活性降低或缺乏, 从而引起结核分支杆菌对 INH 的耐药性. 由此看来, *KatG* 基因突变对于引起结核分支杆菌 INH 耐药性更为重要、更为普遍的原因, 这与目前国内外的研究结果相符, 即 *KatG* 基因完全缺失不是引起 INH 耐药的主要原因, 而 *katG* 基因的突变是引起耐药的主要原因. PCR-SSCP 技术不能给出具体的突变位置, 但作为初筛突变体却简便、高效. 通过与野生型标准株比较, 可在非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳上发现不同的迁移率, 从而筛选出突变体. 由于 sscp 技术适合于检测 400bp 以下片段的突变体, 因此对于象 *katG* 这样较大的片段而言 (>2kb) 必须进行多区域分段筛选, 否则在常见的 315 位区域就不能覆盖象 463 位点这样的突变. 因此, 目前国内以 273bp 左右中心区域作为 PCR-SSCP 工作区域尚有待扩展.

直接测序技术当然对于筛选突变点最为有效, 但不适合大规模的普筛. 因此对于 PCR-SSCP 技术得到的突变体还需进行进一步测序, 测序之后对突变体进行评估, 以明确该突变点是有意突变抑或无意突变.

本部分第二步工作即是利用本课题组导师小组成员之一的李忠明教授的帮助, 以电转化技术对点突变的意义进行评估. 该技术就是国外最早被用于证实 *katG* 基因与异烟肼耐药相关性的经典技术<sup>[15]</sup>. 当时 Zhang 等人选择异烟肼高度耐药、*katG* 基因缺失、致病力低的 *M. smegmatis* 作为载体, 利用电脉冲使 *M. smegmatis* 菌株成为可转导含 *katG* 基因的感受态菌体, 经转化 *katG* 基因后发现 *M. Smegmatis* 菌株恢复了对异烟肼的敏感性. 本课题利用该技术对获得的 S315T 突变体转化 *M. Smegmatis* 菌株, 观察突变的 *katG* 基因是否能使 *M. Smegmatis* 菌株恢复对异烟肼的敏感性. 从而可以判断该点突变是否有意义.

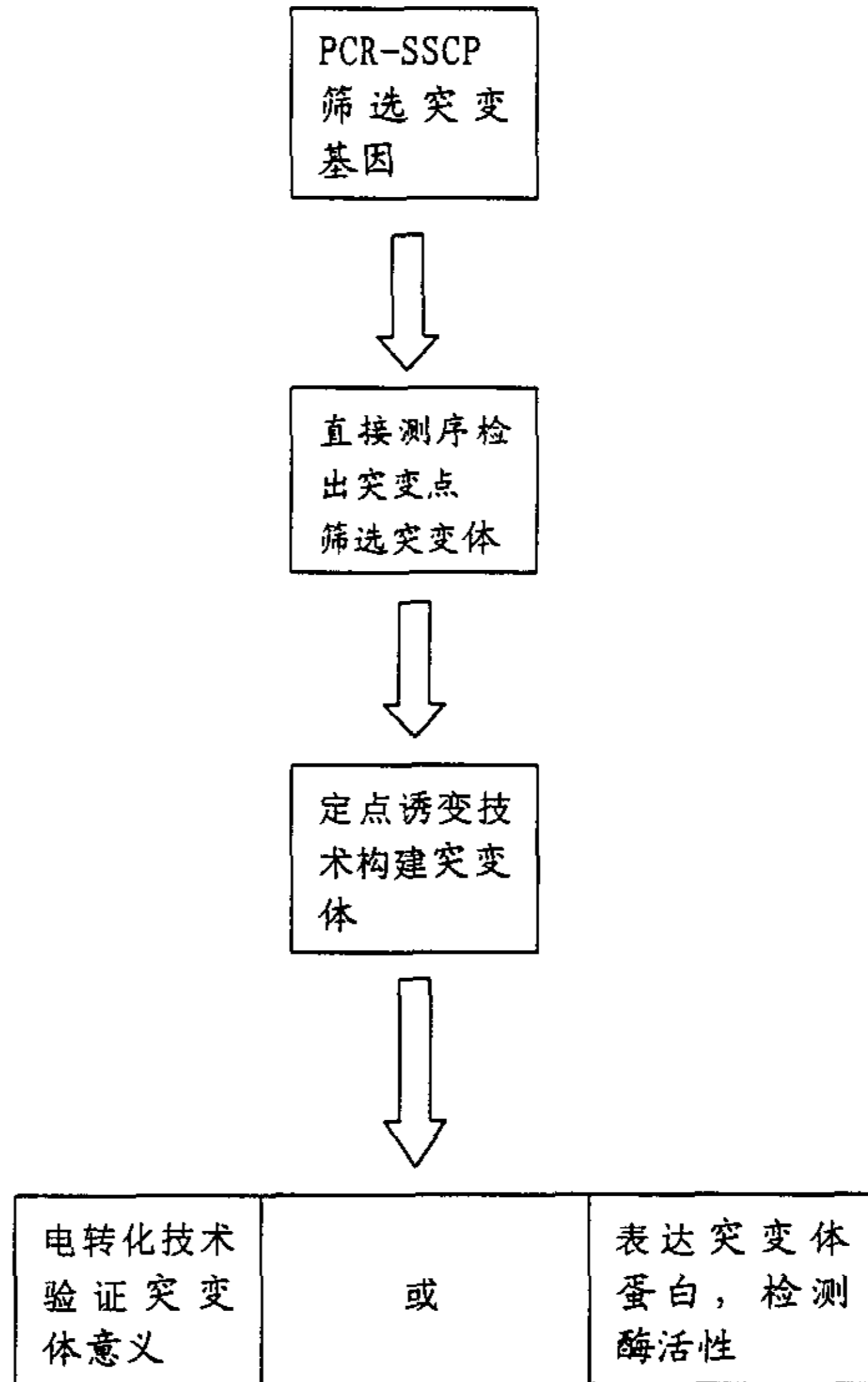
结果发现通过电转化技术, 使对异烟肼高度耐药、*katG* 基因缺失的 *M. smegmatis* 分别获得野生型的 *katG* 基因与 S315T 突变体基因, 获得前者的菌株恢复了对异烟肼的敏感性, 而后者并未恢复耐药菌对异烟肼的敏感性. 从基因水平证实了 S315T 突变在异烟肼耐药机制中的重要性.

本研究结果说明通过电转化技术结合定点诱变技术可以有效评估临床发现的突变体的意义, 从而为临床检测突变菌株奠定可靠的基



础。

总之，结核分支杆菌的 INH 耐药性是涉及 katG 基因多位点突变的复杂事件，单纯依靠分子流行病学得出的现象尚有待于从实验研究予以进一步的证实。从本课题的系列研究中可以得出初步的突变体筛选与评估策略：



通过大量的基础性工作，最终肯定能够给出所有有价值的与异烟肼耐药密切相关的突变点，即可进一步应用基因芯片等技术进行耐药菌株的检测。

## 小结

- 本课题建立了以 PCR-SSCP 技术对异烟肼耐药菌株的 *katG* 基因进行筛查的技术;
- 发现一株存在 sscp 泳动图像异常, 证明在该区域存在点突变, 而其他耐药菌株的耐药机制与该区域无关, 说明 *katG* 基因的常规筛查区段有待扩展
- 本课题在国内首次以电转化技术对点突变的意义进行基因水平的直接验证, 对异烟肼高度耐药、*katG* 基因缺失的 *M. smegmatis* 分别获得 S315T 突变体基因后并未恢复耐药菌对异烟肼的敏感性, 证实了 S315T 突变在异烟肼耐药机制中的重要性.
- 本部分的研究, 目的不在于筛选临床有意义的突变子, 而是试图通过本研究能建立筛选对异烟肼耐药有价值的突变点的方法, 本文结合系列研究的所有结果提出了筛选与评估临床耐药菌株突变点的策略

## 参考文献

1. 吴雪琼, 庄玉辉, 张俊仙, 等. 应用 PCR - SSCP 检测结核分枝杆菌链霉素耐药基因的研究. 中国现代医学杂志, 1997;7: 12, 57
2. Meier A, Kirschner P, Bange FC, et al. Genetic alterations in streptomycin resistant *Mycobacterium tuberculosis*: mapping of mutations conferring resistance. *Antimicrob* 1994;38:228
3. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin - resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996;40(4):1024
4. Rossau R, Thore H, Beenhouwer HD, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997;41(10):2093
5. Altamirano M, Smith JA. Mutations in catalase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis*, 1994,169:1162.
6. 张宗德, 马与, 程绍基, 等. 异烟肼耐药与结核分支杆菌 *katA* 基因突变的研究. 中华结核和呼吸杂志 1996, 19: 346 - 349.
7. Lee AS, Tang LL, Lim IH, et al. Lack of clinical significance for the common arginine-to-leucine substitution at codon 463 of the *katG* gene in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *JID* 1997;176:1125
8. Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, 1992, 358:591.
9. Slayden RA, Barry CE. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2000;2:659
10. 吴雪琼, 庄玉辉, 张晓刚, 等, 结核分枝杆菌耐异烟肼分子机制的研究. 中国防痨杂志, 1998; 20 (1) : 35
11. Lee H, Cho SN, Bang HE, et al. Exclusive mutations related to isoniazid and ethionamide resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000 May;4(5):441

12. 吴雪琼. 结核分枝杆菌对 RFP 耐药的分子机制 (综述). 国外医学抗生素分册, 1998; 19 (3): 218
13. Head SR, Parikh K, Rogers YH, et al. Solid-phase sequence scanning for drug resistance detection in tuberculosis. *Mol Cell Probes*. 1999;13:81
14. Scarpellini P, Braglia S, Brambilla AM, et al. Detection of rifampin resistance by single-strand conformation polymorphism analysis of cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of the central nervous system. *J Clin Microbiol*. 1997;35:2802
15. Zhang Y. Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. *Mol Microbiol* 1993; 8(3):521

## 结核分支杆菌异烟肼耐药性的基因研究进展

目前, 结核病作为一个世界性的问题不仅在发展中国家较为突出, 在一些发达的欧美国家, 结核病的发病也日益严重. 近 10 年来, 全世界范围内结核病发病率又再次回升, 据估计, 目前全世界有 1/3 人口感染过结核杆菌, 其中有 5000 万为耐药菌感染, 而每年约 300 万人死于结核病<sup>[1]</sup>. 鉴于这种严重的结核病现状, 世界卫生组织在 1993 年宣布“全球结核病紧急状态”, 结核病已成为全球最紧迫的公共卫生问题之一.

1952 年, 异烟肼 (INH) 首次用于结核病的临床治疗, 长期以来, 异烟肼都是作为抗痨治疗的, 至今用于临床已有 40 多年历史, 对结核病的有效控制发挥了重要的作用. 但其作用机制以及结核分支杆菌对 INH 耐药性的发生机理尚未完全阐明.

近年来, 由于结核分支杆菌的 INH 耐药性及多药耐药性而引起的结核病的爆发, 尤其在 HIV 感染者及 AIDS 患者中迅速播散. 多药耐药菌感染, 其死亡率高 (72 - 89%), 病程短 (4 - 16 周), 这已引起公众对结核病有效控制的广泛关注<sup>[2]</sup>. 因此, 开发更有效的抗痨药物, 进一步阐明 INH 的作用机制以及结核分支杆菌的 INH 耐药机制, 建立有效、快速的 INH 耐药性诊断方法, 便成为目前我们所要面对的重要任务, 相应地, 也要求我们在结核分支杆菌 INH 耐药性的基因水平上进行更深入的研究.

### 过氧化氢酶活性与 INH 耐药性

早在 1954 年, Cohn 等就首先报道: 在 INH 耐药性结核分支杆菌中过氧化氢酶活性丧失或降低<sup>[3]</sup>. 同年, Middlebrook 的研究也证实了这一点<sup>[4]</sup>, 认为过氧化氢酶在结核分支杆菌 INH 耐药性中起了重要作用. 随后, 国外在这方面出现了大量的研究报告. Wolinsky<sup>[5]</sup> 研究显示: 高度耐药菌 (MIC > 10ug/ml) 中 82%, 中度耐药菌 (MIC > 5ug/ml) 中 9% 都缺乏过氧化氢酶活性. 但有的研究则发现: 过氧化氢酶活性的缺乏仅见于高度耐药菌 (MIC 25 - 100ug/ml) 中<sup>[6]</sup>, 而在中低度耐药菌 (MIC 0.2 - 5ug/ml) 中均有过氧化氢酶的表达<sup>[7]</sup>, 甚至在高度 INH 耐药菌株中也存在很强的过氧化氢酶活性<sup>[8]</sup>. 虽然这些研究结果不尽相同, 但有一点可以肯定: 结核分支杆菌的 INH

耐药性与菌体中过氧化氢酶活性存在某种关系。此后, Youatt 和 Winder<sup>[9,10]</sup>等在这方面进行了大量的酶学研究, 结果发现: 过氧化氢酶与结核分支杆菌之间系表面联系, 从而有助于 INH 的运输, 在过氧化氢酶活性缺乏的耐药菌中, INH 的摄入量是明显减少的。另外, 过氧化氢酶活性与 INH 相互作用的一些代谢产物, 也与 INH 的杀菌活性有关。据此, 他们提出了过氧化氢酶与 INH 相互关系的两种模式: 1. 过氧化氢酶可促进 INH 运输到结核菌菌体中。2. 过氧化氢酶可以对 INH 进行化学修饰, 使之呈现更高的活性形式。进而部分地解释了结核分支杆菌菌体中过氧化氢酶活性缺乏与 INH 耐药性之间的关系。但至于其分子水平的研究, 则长期未能涉入。

### KatG 基因与 INH 耐药性

直到最近, 国外学者才开始对结核分支杆菌 INH 耐药性从基因水平上进行了研究。1992 年, Zhang 等人<sup>[11]</sup>首先从基因水平上证实了结核分支杆菌菌体中过氧化氢酶介导了结核分支杆菌对 INH 的敏感性, 并克隆出编码该酶的基因 (katG 基因)。Zhang 等进一步研究发现: 在 INH 高度耐药菌株 (MIC>50ug/ml) 中有 2/3 缺乏 katG 基因, 若将敏感株的 katG 基因导入耐药菌株中, 能使之恢复对 INH 的敏感性。因此作者认为: 耐药菌株中过氧化氢酶活性的缺乏是由于其编码基因缺失所致, 耐 katG 基因的缺失是结核分支杆菌 INH 耐药性的共同机理。并提出: 可根据 katG 基因与 INH 耐药性的相关性, 而建立一种快速的 INH 耐药性基因诊断方法。但不久, Zhang 和 Young<sup>[12]</sup>等进一步研究却发现: INH 耐药菌中 katG 基因的完全缺失仅 20%。Stoeckle<sup>[13]</sup>的研究也显示: 76% 的耐药菌株都有完整的 katG 基因, 而敏感菌中却有 10% 无 katG 基因。综合近年来国外的文献报道<sup>[13-16]</sup>发现: 即使在 INH 耐药菌株中绝大部分都存在 katG 基因, katG 基因完全缺失仅占耐药菌株的 7-24%。甚至有研究表明: 所有检测的 39 例 INH 耐药菌中无一例 katG 基因完全缺失。由此可见, katG 基因的完全缺失并不是结核分支杆菌 INH 耐药性的主要原因, 以 katG 基因作为 INH 耐药性标志而建立基因诊断方法是缺乏特异性和敏感的。进而推测, 对于大多数 INH 耐药菌株来说, katG 基因的突变或部分缺失可能是导致结核分支杆菌 INH 耐药性更为重要的原因。

### katG 基因的结构

*katG* 基因是 MTB 染色体中的一功能区段, 虽然 MTB 全基因序列目前尚在研究中, 但 *katG* 基因的结构已很清楚。它的上游相隔 44 个碱基与 *furA* 基因相连<sup>[17]</sup>, 下游相隔 2794 个碱基与 *embC* 基因相连。应用 *kpnI* 限制性内切地 MTB INH 敏感标准株 H Rv 进行消化后, 得到一个大约 4810bp 的 DNA 片段, 它作为开放可读框架存在被分析时, 具有高度编码概率价值。*KatG* 基因就位于该片段的第 1979 - 4201 位, 全长 2223bp, 其中 A428bp, C696bp, C740bp, T359bp, C+G 占 64.6%。将此片段转染到一个能在 500 $\mu$ g/ml INH 中生长的耻垢分支杆菌 (*M. smegmatis*) 中, 结果使后者获得了对 INH 的敏感性 (MIC 为 8 - 32 $\mu$ g/ml), 而对其他药物的 MIC 不变, 证实了此 DNA 序列确是 *katG* 基因, 它与 MTB 对 INH 的耐药性呈直接相关<sup>[12, 18]</sup>。Cooderill 以及 Klin 等对 MTB 的 ATCC25618 株的 *katG* 基因含 2223 个核苷酸, 除了第 700 位一个碱基由鸟嘌呤取代了胞嘧啶 [它们的产物均为甘氨酸] 之外, 与 HRv 株的核苷酸种类和顺序都是一样的。但当他们对 MTB 的 HRv-MC 株和 ATCC27294 株进行 *katG* 基因分析时, 则发现它们与 HRv 株的 *katG* 基因序列至少存有 16 个碱基的差异。因此, 在进行 *katG* 基因的研究, 选择 MTB 标准对照株时, 应充分考虑不同菌株间基因差异的可能性, 尽量选用通用的标准株 HRv 株。在对 *katG* 基因进行分子学检测, 尤其是聚合酶链反应 (PCR) 或 DNA 杂交检测时, 其引物和探针的设计应尽可能地避开 *katG* 的变异区域。

### *katG* 基因的同源性和功能

许多微生物都含有 *katG* 基因, 它们与 MTB 基因有较高的同源性。Heym<sup>[19, 20]</sup> 等用一个携带着来自 MTB*katG* 基因的探针进行杂交分析, 结果 MTB H Rv 株和麻风分支杆菌等 6 株分支杆菌均可见有亮度不同的杂交带, 应用氨基酸序列分析显示, MTB*katG* 基因编码的过氧化氢 - 过氧化物酶, 与胞内分支杆菌、大肠杆菌和沙门氏菌、芽孢杆菌属的嗜热脂肪杆菌编码的过氧化氢 - 过氧化物酶, 其氨基酸残基符合率为 60%、53.3%、45.7%, 与来自啤酒酵母菌的细胞色素 C 也有部分同源性, 表明 *katG* 基因的分布是非常广泛的。*KatG* 基因编码产生 heme-containing 酶, 也称为过氧化氢 - 过氧化物酶, 酶分子量为 8000, 在细菌的氧化代谢过程中发挥重要作用。虽然 *katG* 基因广泛存在于其他微生物中, 但众所周知, INH 通常只对 MTB 野生株有效, MIC 多在 0.02 $\mu$ g/ml; 对绝大多数的其他分支杆菌的效果就

差得多,如耻垢分支杆菌最小抑菌浓度(IMC)为32ug/ml;而其他种属的细菌对INH是不敏感的。存在这种现象的机制除了INH靶部位分支菌酸分布的种属特性外,分子生物学的解释是<sup>[18]</sup>:katG能表达两种过氧化酶,一个是由katG基因N端编码产生的作用范围广泛的酶,赋予过氧化物酶活性;另一个是由katG基因C产生的过氧化氢酶。由于katG基因结构的差异,导致绝大多数细菌所产生的过氧化氢酶能优先去除过氧化氢,从而限制了过氧化氢-过氧化物酶对INH的氧化,INH不能转化为毒性结构,使菌体对INH不敏感,而MTB,由于其katG基因编码的过氧化氢酶,缺乏优先去除过氧化氢的能力,因而可转变INH成为致死性的药剂。将MTB的katG基因转染到耻垢分支杆菌和大肠杆菌中,则两种菌均表现出对INH的敏感性。说明MTB的katG基因与其他生物体的katG基因,不仅存有结构上的差异,更表现为功能上的不同。

#### KatG基因突变与INH耐药性

katG基因与INH耐药关系的最初研究结果表明INH耐药与该基因的完全缺失有关。Zhang<sup>[12]</sup>等发现许多耐INH的MTB分离株已降低了过氧化氢酶的活性,其中具有较高耐药(MIC>50ug/ml)的分离株已完全为过氧化氢酶阴性。为了在分子水平上检测此现象,他们用经kpnI消化的含有katG基因的限制性片段对耐药性MTB进行Southern杂交,两个高耐药MTB中没有一个杂交阳性,而在低耐药菌株(MIC≤1.6ug/ml)和敏感株中则杂交阳性。提示高耐药株过氧化氢-过氧化物酶活性丧失是因为它的编码基因-katG基因的缺失造成。Rouse和Merris<sup>[20]</sup>应用美国PE公司设计的包含katGad ldi-56-2220bp全长的11对引物对MTB进行PCR扩增,在5个高度耐药(MIC为50ug/ml)菌株中,有1株未在任何一套引物的PCR中产生扩增带,提示该菌的katG基因已完全缺失。随后的许多研究结果都表明,katG基因的完全缺失,可在许多高度耐药MTB中发现,并且其过氧化氢-过氧化物酶活性全部是阴性<sup>[14,21-22]</sup>。因此从分子生物学角度来说,可以将MTBkatG基因的完全缺失,作为MTB对INH耐药的一个绝对指标。

近年来,国外学者对katG基因结构进行了更为精确的分析。Altamirano<sup>[14]</sup>等的研究第一次提供了katG基因点突变、插入和缺失的直接证据。在他们研究的9株耐药菌中,仅1株(11%)有katG



基因完全缺失，而其余的 8 株经 DNA 序列测定及单链构象多态性 (SSCP) 分析发现均存在点突变，部分缺失及碱基对的插入，这些变异破坏了 *katG* 基因结构导致无活性的基因产物而引起耐药。Pretorius<sup>[23]</sup> 等对 39 例 INH 耐药菌进行 PCR-SSCP 分析，发现 7 株菌有 *katG* 基因突变，并进一步作 DNA 测序以确定突变位点。大量的 DNA 序列分析发现：在 *katG* 基因中，尤以第 463 位点上精氨酸 (Arg) - 亮氨酸 (Leu) 的突变及第 315 位点上丝氨酸 (Ser) - 苏氨酸 (Thr) 的突变最为常见，并已建立了一种简单、快速的检测这种突变的方法<sup>[8, 24]</sup>。

随着研究的深入，*katG* 基因完全缺失的发生率，只占临床分离 INH 耐药株的 20% 以内，而大部分对 INH 耐药的 MTB 仍存有 *katG* 基因。将 *katG* 基因的功能拷贝转染到 INH 耐药菌株中，使后者产生了与 *katG* 探针杂交阳性的结果，但没有过氧化氢 - 过氧化物酶活性的表达<sup>[25]</sup>。这说明在 MTB 耐 INH 的机制中，除了 *katG* 基因的完全缺失外，尚有其他改变的存在。O'Brien<sup>[26]</sup> 等应用 PCR 技术对 30 株 INH 耐药和 28 株 INH 敏感的 MTB 进行分析，在耐药菌株中仅有 2 株出现 *katG* 基因的完全缺失，而所有敏感株则都有 *katG* 的 5' 端和 3' 端的 PCR 产物。Altamirano<sup>[14]</sup> 等对 MTB *katG* 基因分析时发现，在 9 株对 INH 耐药 MTB 中，只有 1 株不产生 *katG* 基因的 PCR 扩增带，提示该基因完全缺失。经 PCR 产物的碱基序列测定分析显示，其滞留时间为 145 分钟，而作为对照的 INH 敏感株的滞留时间为 135 分钟，显示 *katG* 基因存有突变，突变类型包括 1 个碱基或更多碱基的缺失，多达 3 个 bp 的插入，3 - 38 个 bp 的错配等。我国张宗德<sup>[27]</sup> 等采用 Stoeckle 等设计的一对引物对 46 株临床分离的 MTB 进行 PCR 单链构象多态性 (PCR-SSCP) 分析，16 个敏感株和 30 个耐药株均出现 *katG* - PCR 扩增带，显示无 *katG* 基因的缺失。经 SSCP 分析发现，16 个敏感株无突变，17 个存有 *katG* 突变的菌株均为 INH 耐药株，并且与 INH 的耐药程度密切相关，20 个低耐药株 (MIC1 $\mu$ g/ml) 突变率为 35%，而高耐药株 (MIC10 - 50 $\mu$ g/ml) 突变率为 100%。由此可见，*katG* 基因突变较完全缺失是 MTB 发生 INH 耐药的更为常见的原因。

#### *katG* 基因中与 INH 耐药密切相关的密码子

在 MTB *katG* 基因中存在着大量结构和功能氨基酸残基密码<sup>[20, 28]</sup>。

密码子 104、409、463 位的精氨酸, 107、321 位的色氨酸, 108、270、276 位的组氨酸, 138 位的天冬酰胺, 275 位的苏氨酸, 315 位的丝氨酸, 275 位的苏氨酸, 315 位的丝氨酸和 381、695 位的天冬氨酸都是这样的位点。它们可能是过氧化氢-过氧化物酶的结合点或是构成活性基因的必不可少的部分。已证实发生在密码子 275 位的苏氨酸 (ACC) 被脯氨酸 (CCC) 取代的单一突变, 即可使过氧化氢-过氧化物酶活性丧失, INH 敏感性降低。密码子 108 位的组氨酸, 138 位的天冬酰胺的突变也可产生类似的结果。Pretorius<sup>[29]</sup> 等对耐药 MTB *katG* 基因进行 PCR-SSCP 和 DNA 序列分析时发现: 密码子 275 位的苏氨酸、409 位的精氨酸和 695 位的天冬氨酸突变为丙氨酸, 463 位精氨酸突变为亮氨酸, 将导致 *katG* 基因功能紊乱, 出现对 INH 的耐药。在 *katG* 基因突变中, 密码子 463 位的精氨酸 (CGG) 向亮氨酸 (CTG) 的突变是最为常见的<sup>[30, 31]</sup>。在评价 MTB 在此位点突变对 INH 耐药方面意义时尚存有不同观点。有学者<sup>[30]</sup>认为, 此位点是 *katG* 基因重要的功能区段, 决定着过氧化氢-过氧化物酶的活性。而 Shim<sup>[31]</sup>等的观点与此不同, 他在对 50 株 MTB 分析时发现, 78% 的耐药株和 61% 的敏感株都存有此突变, 在分布上无任何具有统计学意义的差异。提示该位点 CGG 向 CTG 的改变可能是 MTB 一个多样性结构, 它们之间的转变与 MTB 对 INH 耐药无关。

总之, MTB 的 *katG* 基因是一 2223bp 的核酸片段, 不同的 MTB 株, 即使是标准菌株其 *katG* 基因中也可以存有少量差异, 这在我们的引物和探针的设计时请加以考虑。MTB 的 *katG* 基因与大肠杆菌等有较高的同源性, 但由于 MTB *katG* 基因结构和功能的特异性, 使 MTB 对 INH 呈独特的敏感性。在评价 *katG* 基因变异与 MTB 耐 INH 的关系方面, 该基因的完全缺失可以作为 MTB 发生耐药的一个绝对指标。除缺失外, *katG* 基因突变是导致 INH 耐药的主要原因, 但突变所造成的影响, 要看基因序列改变的位点在 *katG* 表达中所起作用的轻重。一些决定着表达酶的结合位点和活性基因的碱基出现突变, 必然严重制约了过氧化氢-过氧化物酶的活性, 造成高度的 INH 耐药。如发生在非关键区域内或为对氨基酸顺序无影响的错认突变, 则仅出现程度不同的酶活性降低和 INH 耐药。随着分子生物学技术的不断发展以及新的与耐 INH 有关基因 *inhA*<sup>[25, 26]</sup> 和 *ahpc*<sup>[32]</sup> 基因的发现, 说明 INH 耐药机制除 *katG* 基因外, 其他机制有待深入研究。

## InhA 基因、ahpC 基因与 INH 耐药性

虽然 *katG* 基因突变及其编码的过氧化氢酶活性丧失是导致结核分支杆菌 INH 耐药性的重要机制，但这并不能完全解释所有的 INH 耐药现象。说明在结核分支杆菌 INH 耐药性中，可能存在着其它的耐药机制。1994 年，Banerjee 等<sup>[33]</sup>又克隆出另一个 INH 耐药性相关基因 *inhA* 基因，其参与结核分支杆菌分支菌酸的合成，可能是 INH 作用的又一原始靶基因。研究发现：*inhA* 基因与 INH 低度耐药性有关，而 *katG* 基因与高度耐药性有关，提示在不同程度的 INH 耐药性结核分支杆菌中，其耐药性的发生机理也不一致。进一步对 INH 耐药性结核分支杆菌中 *inhA* 基因进行序列分析，发现了单一点突变造成的 94 位氨基酸由丝氨酸 (Ser) - 丙氨酸 (Ala) 的转化，从而导致了 INH 耐药性。后来，Morris 等对 8 株 INH 耐药菌进行了检测，结果发现有 5 株 (62.5%) 存在 *inhA* 基因突变。Heym 等<sup>[34]</sup>也发现，在 INH 耐药菌中，有 5% 存在 *inhA* 基因突变，25% 为 *inhA* 基因与 *katG* 基因联合突变。Wilson<sup>[35]</sup>的研究进一步证实了：*katG* 和 *inhA* 基因的突变对结核分支杆菌 INH 耐药性起着协同作用。但耐药菌株在导入了 *katG* 基因后，会恢复其敏感性，说明 *katG* 基因在 INH 耐药性中起主导作用。这两个基因的证实，也进一步说明了结核分支杆菌 INH 耐药性存在着不止一种的机制。最近，Wilson<sup>[36]</sup>等又发现了 *ahpC* 基因也与结核分支杆菌 INH 耐药性有关。但至于 *ahpC* 基因的结构、功能、突变位点及与 INH 耐药性的相关关系尚在进一步研究之中。

## 结核分枝杆菌耐药基因型的检测方法

基因突变检测技术是分子生物学的一项基本技术。随着分子生物学的发展，尤其是 PCR 技术的问世，建立于 PCR 基础上的突变检测技术也不断涌现，研究基因的技术大大简化，从而使遗传病的分子诊断技术、细菌耐药分子机制和分子肿瘤学等的研究进入了一个崭新的阶段<sup>[37, 38]</sup>。

**PCR-单链构象多态性分析** PCR-单链构象多态性分析 (single-strand conformation polymorphism analysis, SSCP) 是 1989 年 Orita 等首先报道的一种 PCR 扩增产物的单链 DNA 凝胶电泳技术，现已成为最广泛应用的一种根据单链 DNA 构象差别的快速、敏感、有效的基因突变和 DNA 多态的检测和筛查方法。其原理是 PCR 产物

经变性后可产生两条互补的单链，各单链的碱基序列不同而形成不同的空间构象，如果某一片段的碱基序列发生突变或存在多态性，那么其单链的空间构象将随之变化，经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后不同构象的片段因具有不同的迁移率，而在凝胶上显现出不同的带型，通过与野生型标准株对照，即可确定野生型和突变型基因，但不能确定突变的部位和性质。双链 PCR 产物经变性后，形成碱基序列不同的两条单链，经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后呈现两条单链带。若所呈现的单链带位置与野生型不同，称为泳动变位，即可判定存在基因突变或 DNA 多态性。泳动变位可表现在两条单链带上，也可只表现在一条单链带或在一条单链带上表现明显。但在实际分析中常出现三、四条带，甚至更多条单链带，这是由于在一定的电泳条件下，相同序列的 DNA 单链可按一定的比例形成不同的空间构象；或是非特异性扩增产物形成的条带。个别情况下，DNA 单链电泳甚至不成条带，呈现片状，可能是因为在该电泳条件下，单链 DNA 形成了一系列介于两种构型之间的中间型。有时将 PCR 产物稀释可部分消除这种同分异构体的干扰。此外，采用热变性时通常可见重新退火的双链 DNA 带。其它的 PCR - SSCP 方法还包括：巢氏 PCR-SSCP，其基本原理是设计、合成两对呈巢氏的引物，DNA 模板经一对外部引物扩增后，取其少量扩增产物用一对内部引物再进行一次扩增，以再次扩增产物进行 SSCP 分析。其优点是应用该方法直接检测临床标本中结合分枝杆菌的耐药基因型，可显著提高检测的灵敏度，但应注意避免耐药菌株模板的污染或扩增过程中碱基的错误掺入而导致的假阳性；半巢式 PCR-SSCP：其基本原理是 DNA 模板经一对外部引物扩增后，取其少量扩增产物再以一条内部引物和一条外部引物组成的引物对进行扩增，最终扩增产物进行 SSCP 分析。其操作方法及特点与巢氏 PCR-SSCP 相似，所不同的是少合成了一条外部引物，较经济<sup>[39, 40]</sup>。

**PCR- 限制性片段长度多态性分析** PCR- 限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析的原理是通过 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；若发生基因突变，酶切位点消失，该片段经酶消化后电泳仍显示一条 PCR 扩增片段。其优点是具有较高的特异性，但只能用于分析已知序列特定位点的基因点突变。其他相关的方法还有巢氏 PCR - RFLP。其基本原理是 DNA

模板经巢氏 PCR 扩增后, 其扩增产物进行 RFLP 分析。与 PCR - RFLP 分析相比, 检测的灵敏度显著提高, 而特异性不受影响, 可直接用于分析临床标本中部分结核分枝杆菌 SM 耐药基因型<sup>[41, 42]</sup>。

**DNA 序列测定** 唯有该方法不仅能够用于突变的检测, 而且能够确定突变的部位与性质, 是检测基因突变的决定性方法。但费用昂贵, 一般不用于普筛。

**PCR - 双脱氧指纹图谱** PCR- 双脱氧指纹图谱 ( ddideoxy Fingerprinting, 简称 ddF ) 是由 PCR - SSCP 和双脱氧 DNA 测序结合产生的一种方法。其原理是 PCR 扩增产物变性成单链, 加入一种双脱氧核苷酸, 通过双脱氧核苷酸末端终止法, 形成一系列一端为固定末端, 而另一端长度不同的单链寡核苷酸, 通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析末端在同一碱基的产物的序列差别。若条带出现泳动变位即可判断存在突变。与 SSCP 法相比, 该方法花费的时间多, 工作量较大, 但产生的特异指纹图谱易识读; 而 SSCP 最简便、快速, 但有时产生的链迁移很难识读。与 DNA 循环测序法相比, 两者均为分析双脱氧核苷酸末端终止产物, 测序法需 4 四种双脱氧核苷酸终止反应, 因而需要 4 倍数量的反应管和凝胶泳道, 产物分析需用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳; 而 ddF 法只需一种双脱氧核苷酸、一个反应管和一个凝胶泳道, 产物分析用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 所需时间短、费用低, 但不能确定突变部位与性质。单泳道的 DNA 序列分析不能代替 ddF, 因为若突变的碱基不是正在分析的这种, 就检测不出突变。每种突变经 ddF 分析均可产生特征性的指纹图谱, 提高了检测和鉴别碱基变化的效率, 但也不排除两种不同的突变产生相同指纹图谱的可能性。受突变位置、待检测 DNA 片段大小、温度和其它实验条件的影响较小。扩增产物作为 ddF 分析的模板时, ddF 分析实际上是脱氧核苷酸存在下的再次扩增反应<sup>[43-44]</sup>。

**单链探针反向杂交试验** 单链探针反向杂交试验 ( reverse hybridization-based line probe assay, LiPA ) 是一种建立于 PCR 基础上的反向杂交试验方法。其原理是应用生物素修饰的特异引物扩增 DNA, 使 PCR 产物带有生物素标记物, 将 PCR 产物变性后与固定在已张膜上的特异寡核苷酸探针杂交, 通过酶免疫显色法显示结果。在结核病方面的应用 Innogenetics 公司根据上述原理推出了 INNO - LIPA Rif。结核分枝杆菌检测试剂盒及配套的自动检测仪 ( Auto-LiPA ), 用于检测结核分枝杆菌耐 RFP 基因型。该试剂盒以

rpoB 基因为检测靶序列, 设计了 5 个 (S1~S5) 部分碱基序列重叠的探针, 可与结核分枝杆菌野生型 rpoB 广泛杂交。若在靶序列内存在突变, 其扩增产物在严格的条件下无法与相应探针杂交, 无杂交信号出现就表示存在基因突变, 代表结核分枝杆菌的一种耐 RFP 基因型。此外, 还设计了 4 个能分别鉴定下列 4 种常见突变的 R 探针 (R2、R4a、R4b、和 R5): D516V、H526Y、H526D、5531L 一个结核分枝杆菌复合群特异的探针。这样, 该试剂盒不仅能够检测和鉴定结核分枝杆菌复合群, 同时还能提供该菌株对 RFP 的药敏结果。Rossau 等应用该试剂盒检测 52 株非结核分枝杆菌复合群菌株、107 株已知 rpoB 序列的结核分枝杆菌分离株和 264 株通过传统药敏试验方法检测的结核分枝杆菌临床分离株, 未发现假阳性, 特异度 100%; 假阴性率为 2%, 灵敏度 98%; 最常见的突变类型是 S531L、H526Y 和 H526D, 84% 的突变发生于 526~533 密码子。由此可见, 该试剂盒可简便、可靠地鉴定结核分枝杆菌复合群及其 RFP 耐药性<sup>[45]</sup>。

**RNA: RNA 错配试验** RNA: RNA 错配试验 (RNA: RNA Mismatch Assay) 的原理是待测 DNA 和标准 DNA 的 PCR 扩增产物, 在依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶催化下, 分别转录成互补的单链 RNA (ssRNA); 两者杂交后形成的 RNA: RNA 杂交体若存在单碱错配, 可被 RNA 酶切割, 通过凝胶电泳分析切割产物的大小即可确定错配的位置。根据此原理 Ambion 公司推出了商品化的错配检测试剂盒。应用 Nash 等应用该方法分析 20 株结核分枝杆菌敏感株和 26 株耐 RFP 分离株, 特异度 100%, 灵敏度 96%。虽然其 PCR 扩增引物是分枝杆菌属特异的, 其它非结核分枝杆菌复合群的分枝杆菌 PCR 产物经 RNA 酶处理后均不能检测到 RNA: RNA 双链。因此, 其它菌种存在不会产生假阳性结果。RNA: RNA 错配试验分析 rpoB 基因的区域大于其它方法 (如 SSCP), 在一个单一的试验中能够检出更多的突变; 而且操作简便, 易于分析, PCR 扩增后 4h 即可出结果。此外, 通过更换标准株可以改变错配试验的种特异性, 如用堪萨斯分枝杆菌标准株可检测堪萨斯分枝杆菌耐 RFP 基因型<sup>[46]</sup>。

**复合 PCR** 符合 PCR (MultiplexPCR) 的原理是在一个 PCR 反映体系中, 同时扩增数个基因片段。美国纽约市和佛罗里达州耐多药结核病暴发流行时, 耐 7 种抗结核药物 (INH、RFP、SM、EMB、利福定、卡那霉素和乙硫异烟胺) 的结核分枝杆菌分离株都有相同的 IS6110 DNA 指纹图谱, 该谱型被命名为 212072, 该分离株被命名为

W株, 其插入序列 IS6110 中含有一特异的 NTF-1 序列, NTF-1 不存在于具有其它 15 种 IS6110 谱型的结核分枝杆菌分离株中。根据此特点 Plikaytis 等建立了一种简便、快速、特异地鉴定结核分枝杆菌 W 株的复合 PCR 方法。在该 PCR 反应体系中, 共含有三对引物可同时扩增结核分枝杆菌 W 菌株产生三个 DNA 片段: ①引物 IS62 (5'-ACCAGTACT-GCGGCGACGTC) 和 MDR-7 (5'-CGCGA-GATCTCATCGACAACC) 扩增 W 菌株产生一个 175bp 片段, 它位于 IS6110 3' 端和: NTF-1 序列 5' 端; ②引物 MDR-6 (5'-CCA-GATATCGGGTGTGTCGAC) 和 IS61 (5'-GACCGCGGATCTCTGCGACC) 扩增 W 菌株产生一个 223bp 片段, 它位于 NTF-1 序列 3' 端和 IS6110 5' 端; ③引物 IS59 (5'-GCGCCAGCGCAGGTCGATGC) 和 IS60 (5'-GATCAGCGATCGTGGTCCTGC) 扩增结核分枝杆菌分离株产生一个 523bp 片段, 它位于 IS6110 内, 作为 PCR 反应的内部对照。非 W 菌株只产生 523bp 对照片段, 也可能还有 223bp 或其它 250~500bp 片段, 可能还有 1223bp 或其它 250 约 50 脱 P 片段增但不会同时产生上述三个片段<sup>[47]</sup>。

**异源双链分析** 异源双链分析 (heteroduplex analysis, HDA) 的原理是在一个 PCR 反应体系中, 同时加入野生型 DNA 模板和待测 DNA 模板进行扩增, 若待测模板为突变型, 那么在后期 PCR 循环中即可形成异源双链 DNA 片段。或将野生型 DNA 和突变型 DNA 扩增产物混合后, 变性、退火也可形成异源双链 DNA 片段。由于同源双链 DNA 片段和异源双链 DNA 片段的序列不同, 形成的空间构象也不同, 经普通聚丙烯酰胺凝胶电泳可将两者分开。因此, 通过 HDA 分析可检出基因突变, 其检测灵敏度高, 但操作步骤较多<sup>[48]</sup>。

**变性梯度凝胶电泳** 变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 也是利用野生型和突变型 DNA 电泳迁移率的差异来检测基因突变。双链 DNA 片段通常由不同温度解链区构成, 有高温解链区和低温解链区, 其解链温度 ( $T_m$ ) 取决于它的核着苷酸顺序。当 DNA 片段在温度递增或变性剂浓度递增的凝胶中电泳时, 随着 DNA 迁移至一特定温度或变性剂浓度, DNA 片段的低温解链区打开双链成单链, 其迁移率也大大降低。由于不同序列的 DNA 片段在不同温度或变性剂浓度解链, 在凝胶中的电泳迁移率也就不同。因此, 当基因突变时, 解链过程发生变化, 而可能出现泳动变位。若突变增加了 DNA 低温解链区的  $T_m$  值, 它在较高温度或变

性剂浓度处打开双链,那么它在凝胶中的迁移率比野生型快;相反,若突变降低了DNA低温解链区的 $T_m$ 值,它在较低温度或变性剂浓度处打开双链,那么它在凝胶中的迁移率比野生型慢;若突变不影响低温解链区的 $T_m$ 值,那么突变型和野生型的迁移律相同而无法鉴别[49]。

**恒定变性凝胶电泳** 恒定变性凝胶电泳(constant denaturant gel electrophoresis, CDGE)是一种改良的DGGE,其采用一可使野生型和突变型DNA片段最大程度区别开来的变性剂浓度,使凝胶中变性剂浓度不是递增的而是恒定的,这样DNA片段在凝胶中的迁移率也是恒定的。若基因突变,其迁移率发生变化,即出现泳动变位。与DGGE相比,检验的灵敏度较高,能够检出DNA片段中的所有突变;结果重复性好,凝胶的制备也较简单。操作方法基本上与DGGE相同,所不同的是凝胶中含固定浓度的变性剂。变性剂浓度越高,电泳时间越长[50]。

## 展望

结核分枝杆菌耐药的分子机制研究已取得一些进展,但仍有许多问题值得进一步研究,如:彻底了解上述药物及其它抗结核药物(如利福定、利福布丁、乙硫异烟胺、对氨基水杨酸、卡那霉素、卷须酶素和胺苯硫脲等)的耐药机制。利福布丁(Rifabutin)是另一种利福霉素类药物,体外试验表明约13%有511位、516位和522位rpoB突变的REP高度耐药株,利福布丁的MIC值( $0.25\sim 0.5\mu\text{g/ml}$ )却较低。这说明某些耐REP的结核分枝杆菌分离株对该药敏感,那么两者的耐药机制可能不完全相似,耐受REP的结核病患者加用Rifabutin有可能获得理想的治疗效果。结核分枝杆菌许多药物靶和耐药机制与其它原核生物相似,可借鉴原核生物的研究成果进行这方面的研究。(2)进一步明确各种耐药基因点突变与耐药表型之间的关系。(3)某些耐INH的结核分枝杆菌分离株在豚鼠动物模型中的毒力减弱,还需进一步实验以证明细菌耐药性与毒力之间的关系。(4)根据结核分枝杆菌作用机制和耐药机制开发新的抗结核药物,或从新的广谱抗生素制剂中筛选抗结核新药,如新的斯帕沙星和flouroquinolone就是这样筛选出来的。

综上所述,INH耐药性的机理是非常复杂的,尚有许多领域要研究和探索。今后的研究,除进一步探讨katG基因、inhA基因、ahpC



与 INH 耐药性的相关关系外，还应更多地了解 INH 的作用的位点，作用机制，耐药基因编码酶的调节，以及开发更为特异的 INH 耐药性相关基因，为今后建立快快速、有效的基因检测方法提供理论依据。

## 参考文献

1. Bloom BR, Murray CJL. Commentary on a reemergent killer .  
*Science*, 1992, 257:1055.
2. Neville K, Bromberg A, Bromberg R, et al. The third epidemic multidrug-resistant tuberculosis. *Chest*, 1994, 105:45.
3. Cohn, ML, Kovitz C, Oda U, et al. Studies on isoniazid and tubercle bacilli II. The growth requirements, catalase activities, and pathogenic properties of isoniazid-resistant mutants. *Am Rev Tubere*, 1954, 70:641.
4. Middlebrook G. Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Tubere*, 1954, 69:471.
5. Wolinsky E, Smith MM, Steenken W, et al. Isoniazid susceptibility, catalase activity, and guinea pig virulence of recently isolated cultures of tubercle bacilli. *Am Rev Tubere*, 1956, 73:768.
6. Hedgecock LW, Faucher 10. Relation of pyrogallol-peroxidase activity to isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis. *Am Rev Tubere*, 1957, 75:670.
7. Rastogi N, Mode of action of antituberculous drugs and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol*, 1993, 144:133.
8. Frank R. Rapid identification of a point mutation of the mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase (katG) gene associated with isoniazid resistance. *J Infect Dis*, 1995, 171:240.
9. Youatt J, Tham SH. An enzyme system of mycobacterium tuberculosis that reacts specifically with isoniazid. *Am Rev Respir Dis*, 1969, 100:25.
10. Winder FM. Mode of action of antimycobacteria agents and associated aspects of the molecular biology of mycobacteria. *The biology of mycobacteria*, 1982, 1:354.
11. Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of mycobacterium tuberculosis. *Nature*, 1992, 358:591.
12. Zhang Y, Young DB. Molecular mechanisms of isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends Microbiol*, 1993, 110:109.
13. Stoeckle MY, Guan L, Riegler N, et al. Catalase-peroxidase gene

- sequences in isoniazid-sensitive and resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from New York city. *J Infect Dis*, 1993,168:1063.
14. Altamirano M, Smith JA. Mutations in catalase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis*, 1994,169:1162.
  15. Ferrazoli L, Palaci M, Telles MA, et al. Catalase expression, katG, and MIC of isoniazid for *Mycobacterium tuberculosis* isolates from sao paulo. Brazil. *J Infect Dis*, 1995,17,127.
  16. Brien KL, Dietz HC, Romagnoli M, et al. Evaluation of inhA gene and catalase-peroxidase gene among isoniazid-sensitive and resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Mol Cell Probes*, 1996,10(1):1.
  17. Telenti A, philipp WJ, Sreevatsan S, et al. The emb peron , a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med*, 1997, 3:567-570.
  18. Heym B, Zhang Y, Poulet S, et al. Characterization of the KatG gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 1993,175:4255.
  19. Heym B, Alzari PM, Honore N ,et al. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, katG, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 1995,15:235-245.
  20. Rouse DA, Morris SL. Molecular Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium* and *Mycobacterium bovis*. *Infect Immun*, 1995, 63:1427-1433.
  21. Goto M. Oka S, Tachikawa N, et al. Kat G sequence deletion is not the major cause of isoniazid resistance in Japanese and Yemeni *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Mol Cell Probes*, 1995, 9:433-439.
  22. Martila HJ, Soini H, Huovinen P ,et al. KatG mutations in isoniazid – resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Finnish patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1996,40:2187.
  23. Pretrius GS. Mutations in katG gene sequences in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* are rare. *Antimicrob Agents Chemother* 1995,39:2276.
  24. Musser JM, Kapur V, Williams DL, et al. Characterization of the

- catalase-peroxidase Gene (katG) and inhA locus in isoniazid-resistant and susceptible strains of mycobacterium tuberculosis by automated DNA resistance. *J Infect Dis*, 1996,173:196.
25. Jaber M, Rattan A, Kumar R, et al. Presence of katG gene in resistance in resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Pathol*, 1996, 49:945.
  26. O'Brien KJ, Dietz HC, Romagnoli M, et al. Evaluation of inhA gene and catalase-peroxidase gene among isoniazid-sensitive and resistant Mycobacterium tuberculosis isolates. *Mol Cell Probes*, 1996,10:16.
  27. 张宗德, 马与, 程绍基, 等。异烟肼耐药与结核分支杆菌 katA 基因突变的研究。中华结核和呼吸杂志 1996, 19: 346 - 349。
  28. Rouse DA, Devito JA, Li Z, et al. Site-directed mutagenesis of the katG gene of mycobacterium tuberculosis: effects on Catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol*. 1996,22:583.
  29. Pretorius GS, van-Helden PD, Sirgel F, et al. Mutations in KatG gene sequences in isoniazid resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis are rare. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995,39:2276.
  30. Cockerill FR 3<sup>rd</sup>, Uhl JE, Temesgen Z, et al. Rapid identification of a point mutation of the mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase(katG) gene associated with isoniazid resistance. *J Infect Dis*, 1995, 171:240-245.
  31. Shim TS, Yoo CG, Han SK, et al. Isoniazid resistance and the point mutation of codon 463 of katG gene of Mycobacterium tuberculosis. *J Korean Med Sci*, 1997, 12:92.
  32. Heym B, Stavropoulos E, Honore N, et al. Effects of overexpression of the alkyl hydroperoxide reductase ahpC on the virulence and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*, 1997,65:1395.
  33. Banerjee A, Dubnau A, Quemard V, et al. InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. *Science*, 1994,263:227.
  34. Herm B, Honore N, Truffat-Perrot C, et al. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a

- molecular study. *Lancet*, 1994,344:293.
35. Wilson TM, de Lisle GW, Collins DM, et al. Effect of *inhA* and *katG* on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. *Mol-Microbiol*, 1995,15:1009.
  36. Wilson TM, Collins DM, *aphC*, a gene involved in isoniazid resistance of the mycobacterium complex. *Mol Microbiol*, 1996, 19:1025.
  37. 吴雪琼, 庄玉辉, 张俊仙, 等. 耐多药结核病耐药分子机制的研究. *中华结核和呼吸杂志*, 1997; 20 (6): 332
  38. Morris S, Bai GH, Suffys P, et al. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, *JID*, 1995;171: 954
  39. 吴雪琼, 庄玉辉, 张俊仙, 等. 结核分枝杆菌耐药基因检测. *解放军军医进修学院学报*, 1998; 19 (3): 185
  40. 吴雪琼, 庄玉辉, 张俊仙, 等. 应用 PCR - SSCP 检测结核分枝杆菌链霉素耐药基因的研究. *中国现代医学杂志*, 7(3): 12, 1997
  41. Meier A, Kirschner P, Bange FC, et al. Genetic alterations in streptomycin resistant *Mycobacterium tuberculosis*: mapping of mutations conferring resistance. *Antimicrob* 1994;38:228
  42. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin - resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996;40(4):1024
  43. Githui WA, Hawken MP, Juma ES, et al. Surveillance of drug-resistant tuberculosis and molecular evaluation of transmission of resistant strains in refugee and non-refugee populations in North-Eastern Kenya. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000 Oct;4(10):947-55.
  44. Felmler TA, Oda RP, Persing DA, et al. Capillary electrophoresis of DNA potential utility for clinical diagnoses. *J Chromatogr A*. 1995 Nov 24;717(1-2):127-37.
  45. Felmler TA, Liu Q, Whelen AC, Williams D, et al. Genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance: comparison of single-strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting. *J Clin Microbiol*. 1995 Jun;33(6):1617-23.

46. Rossau R, Thaore H, Beenhouwer HD, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997;41(10):2093
47. Nash KA, Gaytan A, and Inderlied CB. Detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis by use of a rapid, simple, and specific RNA/RNA mismatch assay. *JID*, 1997;176:533
48. Plikaytis BB, Marden JL, Crawford JT, et al. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 1994;32(6):1542
49. Dudczak R, Kletter K, Frischauf H, et al. The use of <sup>123</sup>I-labeled heptadecanoic acid (HDA) as metabolic tracer: preliminary report. *Eur J Nucl Med*. 1984;9(2):81-5
50. Cariello Nf and Skopek TR. Mutational analysis using denaturing gradient gel electrophoresis and PCR. *Mutation Res*, 1993;288t:103
51. Hovig E, Sorensen BS, Brogger A, et al. Constant denaturant gel electrophoresis, a modification of denaturing gradient gel electrophoresis, In mutation detection. *Mutation Res*, 1991;262:23

## 致谢

在完成3年半博士课程之际，我衷心感谢我的导师邬祥惠教授对我几年的学习、工作及科研中所给予的关心与帮助；衷心感谢翁心华教授在我到传染科以来对我的悉心栽培与关怀，他在80年代末高瞻远瞩地建立了与复旦大学生物工程国家重点实验室的科研关系，才使我们现在有机会在复旦大学生命科学院国家重点实验室进修分子生物学技术并开展科研工作；衷心感谢导师组的张清波教授在临床工作和科研中给予的关心与帮助；衷心感谢导师组的李忠明教授对我科研工作所作的详尽指导；衷心感谢华山医院终身教授徐肇珩老师在回国后的百忙之中对我的指导并乐意参加我的答辩会；衷心感谢潘孝彰教授长期以来对我的关心、栽培与指导；感谢石尧忠教授、尹有宽副教授对我的关心与帮助。他们渊博的学识与严谨的治学风范将使我受益终身。回想4年前我分配进入传染科的那一天起，我的成长一直离不开他们对我的关心与帮助。

同时衷心感谢现在远在美国的陈一平副教授，如果说几年来我所在的课题组能顺利完成任务并有所收获的话，离不开他为我们所作的开创性工作。

衷心感谢复旦大学生物工程国家重点实验室的老师与同学们。如果说我所在的课题组现在掌握了一些分子生物学技术并能应用于临床研究的话，离不开复旦大学生物工程国家重点实验室季朝能博士的悉心指导，在此我表示深深的谢意。同时感谢复旦大学生物工程国家重点实验室的金馨博士、姜涛博士给予的无私帮助，感谢硕士生白晓杨同学对复旦医学院同学的大力支持与帮助。我对我两年来在此与他们建立的深厚友谊倍感珍贵并引以为荣。

还要感谢上海疾病控制中心结防科的胡忠义主任，与他的合作才使我们的研究能更具代表性。

感谢课题组的同事与同学，包括现已毕业离开华山医院的王宝林博士、还继续战斗在科研及临床第一线的陈澍博士、李缨博士与庞茂银博士，感谢他们给予的帮助。感谢所有辛勤工作在临床第一线的同事，没有他们承担了大量繁重的临床工作，我不会有足够的时间来完成课题，在此表示深深的谢意。

最后我要感谢我尊敬的父母，没有他们在我人生最关键的时刻给予的支持，我很难完成我的学业。谨将此文献给他们以稍安我长久以往的负疚之心。