

## · 实验研究 ·

结核分枝杆菌利福平耐药基因 *rpoB* 突变特征初步分析

刘敬华 张丽水 刘志广 黄明翔 赵秀芹 王琳 万康林

**【摘要】** 目的 阐明结核分枝杆菌利福平耐药株 *rpoB* 基因突变特点。方法 对 110 株结核分枝杆菌临床分离株包括 *rpoB* 基因利福平耐药决定区(RRDR)81 个碱基在内的 286 bp 片段进行聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)分析,并对经检测显示有突变的结核分枝杆菌 *rpoB* 基因此扩增区域进行序列测定。其中利福平耐药株 73 株,非利福平耐药株 11 株,敏感株 26 株。结果 PCR-SSCP 检测显示利福平耐药株中有 47 株有突变存在,经直接测序分析其中 76.6% 的菌株存在 *rpoB* 基因的单位点突变,主要集中在 531 位(61.1%)和 526 位(25.0%);联合突变发生率为 23.4%。此外,经 PCR-SSCP 检测,11 株非利福平耐药株中 2 株有突变存在,26 株敏感株中 1 株有突变存在。经直接测序分析突变涉及位点为 511 位、526 位和 535 位。结论 *rpoB* 基因耐药决定区发生突变是结核分枝杆菌利福平耐药的主要原因,其中 531 位丝氨酸和 526 位组氨酸是最常见的突变位点。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; 耐药; 聚合酶链反应-单链构象多态性

**Study on the characteristics of mutation on *Mycobacterium tuberculosis* rifampicin-resistance gene** LIU Jing-hua\*, ZHANG Li-shui, LIU Zhi-guang, HUANG Ming-xiang, ZHAO Xiu-qin, WANG Lin, WAN Kang-lin. \*State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: WAN Kang-lin, Email: wankanglin@icdc.cn

**【Abstract】** **Objective** To elucidate the characters of *rpoB* mutation in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** 286 bp DNA fragment of *rpoB* gene including 81 bp code region (rifampin resistance determination region, RRDR) was analyzed by PCR-single-strand conformation polymorphism(SSCP). The 286 bp DNA fragment of each strain which had been proved to have mutation by PCR-SSCP was then sequenced. 110 strains of *M. tuberculosis*, including 73 rifampin-resistant strains, 11 rifampin-susceptible drug-resistant strains and 26 drug-susceptible strains were studied. **Results** 47 rifampin-resistant strains were detected to have mutations by PCR-SSCP method. 76.6% rifampin-resistant strains showed that *rpoB* gene was carrying single point mutation analyzed by direct sequencing technique, which mainly located at 531-Ser(61.1%) and 526-His(25.0%). The combined mutation rate was 23.4%. In addition, 2 rifampin-susceptible drug-resistant strains and 1 drug-susceptible strain were mutated, detected by PCR-SSCP method. Sequencing results showed that the mutations located at 511-Leu, 526-His and 535-Pro. **Conclusion** Mutations in the 81 bp RRDR of *rpoB* were the main reasons of *M. tuberculosis* resistant to rifampin. 531-Ser and 526-His were the most common positions of mutations.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Drug resistance; PCR-single-strand conformation polymorphism

结核病仍然是严重危害着人民健康的传染病之一。20 世纪 80 年代后期开始,结核病疫情在世界

范围内急剧恶化,各国的结核病疫情均呈回升趋势<sup>[1]</sup>。在 WHO 最近公布的全球 38 个国家和地区的结核病耐药监测资料中,中国被列为“特别引起警示的国家和地区”之一。全国第四次结核病流行病学调查结果显示<sup>[2]</sup>,中国总耐药率高达 27.8%,主要抗结核药物利福平(RFP)的耐药率较高(16.6%),其初始耐药率达 10.3%,获得性耐药率达 29.5%。并且与第二次和第三次流行病学调查资料相比,对

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471526)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室(刘敬华、刘志广、赵秀芹、万康林);福建省福州市肺科医院(张丽水、黄明翔、王琳)

刘敬华和张丽水同为第一作者,福建省福州市肺科医院对本文有同等贡献

通讯作者:万康林, Email: wankanglin@icdc.cn

利福平药物的获得性耐药率呈明显升高的趋势。

RFP 是抗结核联合化疗中主要的一线药物,据报道,90% 的 RFP 耐药菌株同时对异烟肼 (INH) 耐药,而单耐 RFP 菌株很少,因而检测利福平耐药性可作为耐多药结核病 (multidrug-resistant TB, MDR TB) 的标志<sup>[3,4]</sup>。由此可见,利福平分子机制的研究显得尤为重要,由此获得的快速检测方法将在结核分枝杆菌耐药的临床检测和相关基础研究的工作实践中具有广泛的应用价值。本研究通过对福建地区结核分枝杆菌的研究,采用 PCR-单链构象多态性 (SSCP) 方法筛查结核分枝杆菌利福平耐药相关基因 (*rpoB*) 的突变株,再进一步对突变株的 *rpoB* 基因进行测序,分析其突变特点,以期阐明我国结核分枝杆菌利福平耐药机制及耐药的分子基础,为建立适合我国临床菌株的快速耐药检测方法提供科学的理论依据。

### 材料与方 法

1. 菌株来源:结核分枝杆菌标准菌株 H<sub>37</sub>Rv 购自中国药品生物制品检定所。110 株结核分枝杆菌临床分离株均来源于福州市肺科医院,分离时间为 2004 年 1-12 月。其中结核分枝杆菌药物敏感株 26 株,非利福平耐药株 11 株,利福平耐药株 73 株,均为多耐药株。按全国结核病细菌学检验标准化规程进行分枝杆菌分离培养、菌种鉴定,药敏实验采用 BACTEC™ MGIT™ 960 全自动快速分枝杆菌培养鉴定药敏系统进行检测 (表 1)。

表 1 结核分枝杆菌分离株药敏检测结果

菌株分类	菌株数	利福平	异烟肼	乙胺丁醇	链霉素
耐药株 (84 株)					
利福平耐药株 (73 株)	38	R	R	R	R
	5	R	R	R	S
	18	R	R	S	R
	9	R	R	S	S
	1	R	S	R	R
	1	R	S	S	S
非利福平耐药株 (11 株)	9	S	R	R	R
	1	S	R	R	R
	1	S	R	R	R
敏感株 (26 株)	26	S	S	S	S

注:R:耐药; S:敏感

2. 主要试剂: Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自华美生物工程公司, GoldView™ DNA 染料购自赛百盛公司。

3. 细菌 DNA 的制备:取常规于 L-J 培养基培养、生长良好的结核菌一菌环菌落溶于 500 μl TE (pH 值

8.3) 中,在旋涡振荡器上震荡至块状固体菌落均匀溶于 TE 中,沸水浴 15 min,快速离心,取上清备用。

4. 引物设计与合成:引物由赛百盛公司合成。上游引物 P1 5'-CAG GAC GTG GAG GCG ATC ACA-3';下游引物 P2 5'-CCG ACA GCG AGC CGA TCA GAC-3',可扩增 *rpoB* 基因内包含 81 bp 利福平耐药决定区 (RRDR) 的 286 bp 片段。采用 25 μl PCR 反应体系,其中包括模板 DNA 5 μl、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.2 mmol/L dNTP、上下游引物各 15 pmol 和 1.5 U Taq DNA 酶。PCR 反应条件:预变性 94℃ 10 min;循环 94℃ 1 min,63.3℃ 1 min,72℃ 90 s,共 30 个循环;最后延伸 72℃ 10 min。在 2% 琼脂糖凝胶中电泳检测 PCR 产物。

5. SSCP 分析:将临床分离株与结核分枝杆菌标准株 H<sub>37</sub>Rv 的 DNA PCR 扩增产物加在同一块 8% (29:1) 非变性聚丙烯酰胺凝胶中,于 4℃ 120 V 电泳过夜,硝酸银染色后观察结果并照相。

6. 结果判定:双链 PCR 产物经变性后形成两条单链,经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后呈现两条单链。若所呈现的单链位置与野生型不同,成为泳动变位,即可判定存在基因突变。

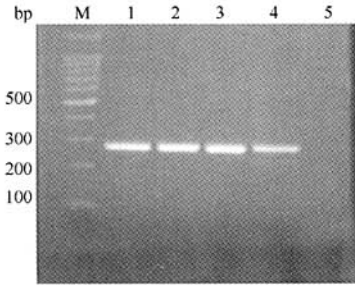
7. PCR 产物纯化及 DNA 测序:PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,用 QIAGEN 公司 DNA 胶回收试剂盒回收纯化 DNA 片段,PCR 产物送六合通公司测序。

### 结 果

1. PCR-SSCP 分析:110 株结核分枝杆菌临床分离株 PCR 均成功扩增,可见单一清晰的目的条带,扩增产物大小约为 286 bp,与预期结果一致 (图 1)。以结核分枝杆菌标准株 (H<sub>37</sub>Rv) *rpoB* 基因的扩增产物作为对照,进行 SSCP 分析 (图 2)。110 株结核分枝杆菌中,其中 26 株为药物敏感株,84 株为耐药株,且均为多耐药株,在耐药株中,11 株为非利福平耐药株,73 株为利福平耐药株。经 PCR-SSCP 检测,在 73 株利福平耐药株中,47 株出现泳动变位,突变率为 64.38% (47/73);11 株非利福平耐药株中,2 株出现泳动变位;26 株敏感株中 1 株出现泳动变位 (表 2)。

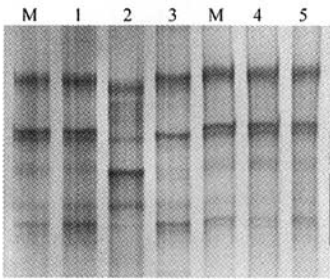
2. 直接测序分析:经 SSCP 检测出现 *rpoB* 基因泳动变位的 50 株结核分枝杆菌,经 PCR 产物直接测序结果与标准菌株 H<sub>37</sub>Rv 利福平耐药基因 *rpoB* (NC\_000962) 比较,证实均发生了基因突变,其中

利福平耐药菌株 47 株,利福平敏感耐药株 2 株,敏感菌株 1 株。



M. DNA 标准; 1. H<sub>37</sub>Rv 标准株; 2~4. 临床分离株; 5. 阴性对照

图1 rpoB 基因扩增片段电泳



M. H<sub>37</sub>Rv 标准株; 1~5. 临床分离株,其中 2,3 经 SSCP 检测可见泳动变异

图2 rpoB PCR-SSCP 银染法检测结果

表2 结核分枝杆菌 rpoB 基因 PCR-SSCP 检测结果

菌株分类	菌株数量	PCR-SSCP 检测突变菌株数	突变率 (%)
利福平耐药株	73	47	64.38
非利福平耐药株	11	2	18.18
药物敏感株	26	1	3.85
合计	110	50	45.45

(1)利福平敏感株:敏感株中 1 株 PCR-SSCP 检测泳动异常的菌株 rpoB 基因发生 526 位 CAC→AAC 单位点突变;利福平敏感的耐药株 2 株 PCR-SSCP 检测泳动异常的菌株中有 1 株发生 511 位 CTG→CCG 单位点突变,另 1 株发生了双位点联合突变,突变位点为 526 位 CAC→AAC 和 535 位 CCC→CTC。

(2)利福平耐药株:47 株经 SSCP 检测出现泳动变异的利福平耐药株 rpoB 基因直接测序结果见表 3。结果表明均发生 rpoB 基因突变,且均涉及 rpoB 基因的高突变区 RRDR(利福平耐药决定区),突变类型包括 20 种,涉及 10 种氨基酸,其中 76.6% (36/47)的菌株发生 rpoB 基因的单位点突变,主要集中在 531 位 61.1% (22/36)和 526 位 25.0% (9/36),两

者突变率之和为 80.6% (29/36);23.4% (11/47)的菌株发生了联合突变,共有 11 种联合突变类型,绝大多数为点突变,只有 2 株例外,其中 1 株涉及 490 与 491 位之间发生插入突变,插入碱基 C,另 1 株涉及 491 位缺失突变,编码基因 ACG 中间碱基 C 缺失;经检测未见同义突变发生。

讨 论

利福平自 1971 年发明以来,一直是结核化疗方案中的一个关键药物,它是一种快速杀菌剂,可缩短结核病的疗程,特别是在短程化疗中起重要作用<sup>[5]</sup>。利福平的药物作用机理主要是通过与 RNA 聚合酶 β 亚基特异结合,抑制 RNA 聚合酶活性,干扰分枝杆菌 RNA 的转录及延伸,阻碍蛋白质合成从而发挥抗菌作用。

rpoB 基因是细菌 RNA 聚合酶 β 亚基的编码基因,含有 3534 bp 的开放阅读框架 (GenBank L27989),编码 1178 个氨基酸。rpoB 基因少数密码子突变引起它所编码的氨基酸改变,使 RNA 聚合酶分子原有 RFP 结合点的构象发生改变,失去结合 RFP 的能力,而导致 RFP 耐药。继 1993 年美国学者 Telenti 等<sup>[6]</sup>首次对 rpoB 基因核心区进行 DNA 序列分析后,利福平耐药结核分枝杆菌 rpoB 基因的突变特点的研究在多个国家成为热点<sup>[7,8]</sup>。

本研究共对 47 株结核分枝杆菌利福平耐药株的 rpoB 基因易突变区进行了 DNA 序列分析,发现所有研究菌株的突变均与 rpoB 基因的高突变区 RRDR(利福平耐药决定区)相关,所有突变均集中于 81 bp 的核心区域内,与国内外报道一致。突变类型包括 20 种,涉及 10 种氨基酸。有 36 个利福平耐药菌株发生 rpoB 基因的单位点突变,主要集中在 531 位 61.1% (22/36),发生了从胞嘧啶向胸腺嘧啶的转换,使 531 位的丝氨酸转换为亮氨酸。其突变频率略高于日本 (43%, 50/117)、美国 (32%, 69/214)的报道,而与德国 (71%, 17/24)、意大利 (59%, 22/37)和希腊 (56%, 9/16)报道相似。另外一个突变发生频率较高的氨基酸是位于 526 位的组氨酸,其突变率为 25.0% (9/36),其中 5 株菌株其相应密码子 CAC 的中间位置的胞嘧啶发生突变,4 株颠换为鸟嘌呤,1 株转换为胸腺嘧啶;4 株相应密码子的 CAC 第一位的腺嘌呤发生突变,3 株转换为鸟嘌呤,1 株颠换为胞嘧啶。此位点的高突变率的报道尚可见于意大利 (30%, 11/37)、希腊 (19%, 3/16),我国

表3 利福平耐药结核分枝杆菌突变株(47株) *rpoB* 基因突变分布情况

编号	氨基酸位置 <sup>a</sup>	氨基酸位置 <sup>b</sup>	密码子改变	氨基酸改变	样本数	构成比 (%)	突变率 (%)
1	513	438	CAA→CCA	Gln→Pro	1	2.1	1.4
2	516	441	GAC→TAC	Asp→Tyr	3	6.5	4.1
3	522	447	TCG→TTG	Ser→Leu	1	2.1	1.4
4	526	451	CAC→GAC	His→Asp	3	6.5	4.1
5	526	451	CAC→AAC	His→Asn	1	2.1	1.4
6	526	451	CAC→CGC	His→Arg	4	8.6	5.5
7	526	451	CAC→CTC	His→Leu	1	2.1	1.4
8	531	456	TCG→TTG	Ser→Leu	22	46.9	30.1
9	511	436	CTG→CCG	Leu→Pro	1	2.1	1.4
	516	441	GAC→GGC	Asp→Gly			
10	511	436	CTG→CGG	Leu→Arg	1	2.1	1.4
	516	441	GAC→GGC	Asp→Gly			
11	491	416	ACG→A_G		1	2.1	1.4
	526	451	CAC→CGC	His→Arg			
12	491	416	ACG→CAG	Thr→Gln	1	2.1	1.4
	526	451	CAC→GAC	His→Asp			
13	530	455	CTG→CGG	Leu→Arg	1	2.1	1.4
	531	456	TCG→TTG	Ser→Leu			
14	508	433	ACC→CCC	Thr→Pro	1	2.1	1.4
	526	451	CAC→TAC	His→Tyr			
15	516	441	GAC→GAA	Asp→Glu	1	2.1	1.4
	526	451	CAC→AAC	His→Asn			
16	490	415	CAG→CAC	Gln→His	1	2.1	1.4
	531	456	TCG→TTG	Ser→Leu			
17	511	436	CTG→CCG	Leu→Pro	1	2.1	1.4
	516	441	GAC→TAC	Asp→Tyr			
18	490~491插入C	415~416插入C			1	2.1	1.4
	526	451	CAC→AAC	His→Asn			
	535	460	CCC→CTC	Pro→Leu			
19	490	415	CAG→CAC	Gln→His	1	2.1	1.4
	516	441	GAC→TAC	Asp→Tyr			
	526	451	CAC→GAC	His→Asp			

a. 采用大肠埃希菌克隆的 *rpoB* 基因编号; b. 采用结核分枝杆菌克隆的 *rpoB* 基因编号

学者黄海荣、金奇也有类似的报道(17.1%, 33/193),我国乐军报道其研究结果此位点的突变率高达40%,与吴雪琼报道相似。研究结果显示,531位和526位氨基酸突变率之和是80.6%(29/36),可见这两个氨基酸的突变在我国利福平耐药结核分枝杆菌 *rpoB* 基因的突变中最为常见。此外,516位天冬氨酸突变率较高,为6.5%(3/36),突变类型均为相应密码子 GAC 第一位的鸟嘌呤颠换为胸腺嘧啶。与国外报道相一致。513位谷氨酰胺的突变在国外报道亦为较常见氨基酸突变位点,本研究结果显示其突变率并不高,只有2.2%(1/36),与黄海荣、金奇报道相似(3.1%)。

本研究结果还显示有23.4%(11/47)的菌株发生了联合突变,与国内外报道相比发生率较高。这是我们本次所研究的利福平耐药菌株 *rpoB* 基因突变的特点,还是由于抽样误差所致,尚不能做出定论,需进一步扩大选样地区,扩大样本量来加以验证。本研究发现的联合突变共有11种不同的组合,绝大多数突变类型为点突变,只有两株例外,其中一

株涉及490与491位之间发生插入突变,插入碱基C,另一株涉及491位缺失突变,编码基因ACG中间碱基C缺失;11种联合突变中有6种均涉及526位的组氨酸,5种涉及516位天冬氨酸,提示这两个位点氨基酸发生突变以后,可能容易引起其他位点上氨基酸的突变。经检测未见同义突变发生。

本研究中检测到1株敏感株和2株利福平敏感的耐药株发生 *rpoB* 基因的突变,涉及511、526及535三个氨基酸位点,考虑其原因可能是由于这三个位点并非利福平耐药特异突变位点;另外,也可能是由于个别菌株药敏实验结果不准确所致,本研究所应用菌株的耐药背景检测均应用BACTEC™ MGIT™ 960全自动快速分枝杆菌培养鉴定药敏系统确定,因此,尚需我们进一步

的鉴定加以证实。

#### 参 考 文 献

- 1 World Health Organization. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: The WHO/ IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance; Report No. 2. Prevalence and Trends. Geneva: WHO/IUATLD, 2000. 1-107.
- 2 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国结核病流行病学抽样调查办公室. 2000年全国结核病流行病学抽样调查报告. 中国防痨杂志, 2002, 24: 65-108.
- 3 Drobniwski FA, Wilson SM. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*——a molecular story. J Med Microbiol, 1998, 47: 189-196.
- 4 Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, et al. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1998, 36: 1969-1973.
- 5 Mitchison DA. Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis, 1986, 133: 423-430.
- 6 Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet, 1993, 341: 647-650.
- 7 Mark T McCammon, John S Gillette, Derek P, et al. Detection of *rpoB* Mutation Associated with Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49: 2000-2009.
- 8 乐军,曾而良,谢建平,等. 中国耐多药结核分枝杆菌临床分离株 *rpoB* 基因突变特点. 遗传学报, 2004, 31: 1332-1336.

(收稿日期: 2006-06-02)

(本文编辑: 王多春)