

结核分枝杆菌毒素-抗毒素伴侣系统基因多态性初步研究

肖彤洋 赵丽丽 刘海灿 李马超 赵秀芹 万康林

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 传染病诊治协同创新中心

通信作者: 万康林, Email: wankanglin@icdc.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.03.021

【摘要】 目的 研究结核分枝杆菌毒素-抗毒素伴侣(TAC)系统中 *higA*、*higB* 和 *Rv1957* 在结核分枝杆菌及其不同亚型菌株中的基因多态性,并探讨其生理意义。**方法** 选取 183 株结核分枝杆菌临床菌株,经间隔区寡核苷酸方法进行基因分型,同时分析 TAC 系统基因 *higA*、*higB* 和 *Rv1957* 的 PCR 扩增及序列,利用 I-Mutant 2.0 软件预测非同义突变对蛋白结构和功能的影响。**结果** 183 株中 138 株(75.41%)属北京家族,45 株(24.59%)属非北京家族。共 149 株菌(81.42%)的 TAC 系统发生突变,包括 2 种同义突变和 6 种非同义突变:同义突变发生于 *higA* 基因,仅见于北京家族菌株;3 个基因均可见非同义突变,其中 2 种非同义突变仅见于非北京家族菌株,其余 4 种突变仅见于北京家族菌株。6 种非同义突变中有 4 种突变可能影响蛋白的功能。位于 *higA* 基因的 CAC121CAT 突变位点在单耐链霉素和单耐利福平菌株中的突变频率高于敏感株,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 结核分枝杆菌中的 TAC 系统具有一定的基因多态性,其中北京家族呈现更高的多态性水平,可能更有利于适应不同的宿主环境。

【关键词】 结核分枝杆菌; 毒素-抗毒素伴侣系统; 基因多态性; 基因分型

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2015CB554202); 国家科技重大专项(2013ZX10003006-002-001); 传染病预防控制国家重点实验室项目(2011SKLID208)

Polymorphisms of toxin-antitoxin-chaperone system of *Mycobacterium tuberculosis* complex in China Xiao Tongyang, Zhao Lili, Liu Haican, Li Machao, Zhao Xiuqin, Wan Kanglin
State Key Laboratory of Communicable Disease Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Communicable Diseases, National Institute for Communicable Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: Wan Kanglin, Email: wankanglin@icdc.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the single nucleotide polymorphism (SNP) of toxin-antitoxin-chaperone (TAC) system of *Mycobacterium (M.) tuberculosis* with different genotypes and its biological significance. **Methods** A total of 183 clinical *M. tuberculosis* isolates were collected for spoligotyping. The sequences of *higA*, *higB* and *Rv1957* were obtained by using PCR and DNA sequencing. The sequences were compared for possible mutations. Functional consequences of nonsynonymous SNPs were predicted by using I-Mutant 2.0 servers. **Results** Among the 183 *M. tuberculosis* isolates, 138(75.41%) belonged to the Beijing family, while 45(24.59%) belonged to the non-Beijing family. A total of 149(81.42%) isolates showed polymorphisms in the TAC system. We discovered 6 nonsynonymous SNPs and 2 synonymous SNPs. All the synonymous mutations occurred in *higA* gene, while nonsynonymous SNPs were found in the *higA*, *higB* and *Rv1957* genes either. All the synonymous mutations and 4 nonsynonymous SNPs were restricted to the Beijing family strains and only 2 nonsynonymous SNPs were observed in the non-Beijing family strains. Of the 6 nonsynonymous SNPs studied, 4 were predicted to have ability to affect the stability of respective protein. **Conclusion** The SNPs in the coding sequences of TAC system in clinical isolates can be relatively high and the Beijing family strains are with higher polymorphism, which might benefit to adapt to different host environment.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Toxin-antitoxin-chaperone systems; Gene polymorphism; Genotyping

Fund programs: Key National Basic Research Program of China (2015CB554202); National Science and Technology Major Project of China (2013ZX10003006-002-001); Project of State Key Laboratory of Communicable Disease Prevention and Control of China (2011SKLID208)

结核分枝杆菌持留菌的存在是导致肺结核复发和耐药的重要原因^[1],其产生原因认为与毒素-抗毒素系统(toxin-antitoxin system, TAs)有关^[2-3]。TAs由2个共表达的基因,即基因编码稳定的毒素蛋白(toxin)和基因编码不稳定的抗毒素蛋白(antitoxin)组成,二者通过蛋白与蛋白的相互作用形成复合体,抗毒素可中和毒素的作用,共同参与调控胞内基因表达及细胞程序性死亡等过程^[4]。目前已发现的结核分枝杆菌TAs由88对编码毒素-抗毒素蛋白的基因组成,包括*RelBE*、*MazEF*、*ParDE*、*VapBC*、*HigAB*等家族。新近研究表明,尽管大部分TAs的编码基因具有保守性,但仍有少量编码基因在某些菌株中呈现多态性^[5]。毒素-抗毒素伴侣(toxin-antitoxin-chaperone, TAC)隶属*HigAB*家族的一对由抗毒素HigA、毒素HigB及分子伴侣Rv1957三者共同组成的非典型TAs[编码抗毒素蛋白的基因*higA*(*Rv1956*)位于编码毒素蛋白基因*higB*(*Rv1955*)的下游,与典型TAs不同^[6]]。为此本研究分析TAC系统在结核分枝杆菌不同亚型菌株中的基因多态性,并探讨其生理意义。

材料与方法

1. 菌株来源:183株结核分枝杆菌临床分离株及标准菌株H37Rv均由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所结核病室传代、培养及保存。
2. DNA模板制备:采用水煮法提取结核分枝杆菌基因组DNA。刮取罗氏培养基上新鲜菌落50~100 mg,重悬于200 μl Tris-EDTA缓冲液,置于85 °C 30 min,然后100 °C 10 min,离心收集上清,贮存于-20 °C备用。
3. Spoligotyping分型:PCR扩增DNA间隔区(引物为DRa: 5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3', DRb: 5'-CCGAGAGGGGACGAAAC-3')。扩增产物与固定的43对寡核苷酸探针杂交,其中37个间隔区序列来源于H37Rv标准株的DR区序列,其余来源于*M. bovis* BCG的DR区序列^[7]。
4. 药敏试验:采用比例法。培养基内4种一线药物终浓度分别为异烟肼(INH)0.2 μg/ml、利福平(RFP)40 μg/ml、链霉素(SM)4.0 μg/ml、乙胺丁醇(EMB)2.0 μg/ml。均购自美国Sigma公司。
5. TAC基因的PCR及测序:根据标准菌株

H37Rv的基因序列(NC_000962.3)使用Primer 5.0软件设计引物,扩增引物序列见表1。PCR体系总体积为25 μl,其中2×Taq PCR MasterMix 12.5 μl,无菌去离子水10.5 μl,上游引物0.5 μl,下游引物0.5 μl,基因组DNA 1.0 μl。PCR反应条件为94 °C预变性10 min;94 °C变性1 min,60 °C退火1 min,72 °C延伸1 min,35个循环;72 °C延伸10 min。PCR扩增阳性对照孔以H37Rv基因组DNA为模板,阴性对照孔以无菌去离子水为模板。PCR产物由北京擎科新业生物技术有限公司测序后,使用Bioedit 7.0.5.3软件将测序结果与标准株H37Rv序列(GenBank序列号:NC_000962)进行比对。

表1 PCR和测序引物

引物	序列(5' ~ 3')	退火温度(°C)	产物(bp)
higAB-f	GTCCAAGCCGGACAACGA	60	937
higAB-r	TCGTGGCGTCGGTTCGGTTCAGT		
Rv1957-f	GTGGGTGCAGACAAGGAAAT	60	710
Rv1957-r	CCCCTGCCGCTGGGCTGACA		

6. 非同义突变对蛋白结构和功能影响的预测分析:利用I-Mutant 2.0 (<http://folding.biofold.org/cgi-bin/i-mutant2.0.cgi>)对突变位点进行蛋白功能影响的预测^[8]。
7. 统计学分析:采用SAS 9.2软件进行χ²检验分析,P<0.05认为差异有统计学意义。

结 果

1. 菌株分型:183株结核分枝杆菌临床分离株包括北京家族138株和非北京家族45株(包括T、H、U、CAS、MANU2、LAM和New,分别为19、6、3、3、3、2、9株),基本涵盖我国多数地区已发现的主要基因型。
2. TAC系统基因的多态性:对于编码TAC系统的3个基因,在183株菌中有149株菌发生突变,包括6种非同义突变和2种同义突变(表2)。同义突变均发生在*higA*基因中,138株北京家族菌的121位点均由CAC突变为CAT,其中2株菌的95位点由CTG突变为TTG;在*higA*基因的149位点发生非同义突变,即GCA突变为TCA,导致编码的氨基酸由丙氨酸(Ala)突变为丝氨酸(Ser),此类突变仅发生在11株非北京家族菌中,其中1株菌同时携带

表 2 183 株结核分枝杆菌临床分离株 TAC 操纵子基因突变情况

基因	核苷酸突变	氨基酸突变	突变菌株数		联合突变	基因突变频率(%)				
			北京家族	非北京家族		耐INH株 (n=131)	耐RFP株 (n=126)	耐SM株 (n=96)	耐EMB株 (n=76)	耐多药株 (n=125)
<i>higA</i>	CAC→CAT	His 121 His	136	0		78.63	80.95*	82.29*	82.89	80.80
	CAC→CAT	His 121 His	2	0	CTG→TTG (Leu 95 Leu)	0.76	0.79	1.04	0.00	1.60
	GCA→TCA	Ala 149 Ser	0	10		6.11	5.56	5.21	3.95	5.60
	GCA→TCA	Ala 149 Ser	0	1	CTC→CGC (Leu 111 Arg)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>higB</i>	GAC→GAG	Asp 30 Glu	17	0		9.92	10.32	8.33	9.21	10.40
	GTG→GGG	Val 1 Gly	1	0		0.76	0.79	1.04	0.00	0.80
<i>Rv1957</i>	GAC→GAG	Asp 147 Glu	1	0		0.76	0.79	1.04	1.32	0.80
	GCG→GTG	Ala 81 Val	1	0		0.76	0.79	0.00	1.32	0.80

注: * χ^2 检验 $P < 0.05$

111 位点的非同义突变(CTC→CGC),氨基酸由亮氨酸(Leu)变为精氨酸(Arg)。对 *higB* 基因序列分析发现,有 17 株北京家族菌的 30 位点发生非同义变(GAC→GAG),致使编码的氨基酸由天冬氨酸(Asp)突变为谷氨酸(Glu),另有 1 株菌携带第 1 位点的突变(GTG→GGG)。*Rv1957* 基因发生 81(GCG→GTG)和 147(GAC→GAG)位点的非同义突变,分别见于 2 株不同的北京家族菌株。

3. 突变基因与耐药相关性分析:经药敏试验,183 株菌包括耐药菌 132 株(72.13%)和敏感菌 51 株(27.87%)。采用 χ^2 检验分析突变情况,耐药株中 *higA* 基因的多态性超过敏感株,其中耐 INH 株($\chi^2 = 2.57, P = 0.11$)、耐 SM 株($\chi^2 = 7.58, P = 0.01$)、耐 RFP 株($\chi^2 = 6.70, P = 0.01$)、耐 EMB 株($\chi^2 = 3.93, P = 0.05$),*higB* 及 *Rv1957* 的多态性在 2 种菌株间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4. 突变预测分析:在检测到的 6 个异义突变中,有 4 个突变对蛋白质结构的稳定性影响较大(DDG 值 < 0 代表破坏蛋白质的稳定性,DDG 值 > 0 代表增强蛋白质的稳定性),其中有 3 个仅发生在北京家族菌株中(表 3)。对同义突变的密码子使用频率进行分析,编码 His 的野生型密码子 CAC 使用频率为 1.49,突变后的密码子 CAT 使用频率为 0.51,编码 Leu 的野生型密码子 CTG 使用频率为 3.44,突变后的密码子 TTG 使用频率为 1.06。

表 3 结核分枝杆菌 6 个非同义突变的 DDG 预测值

基因	核苷酸突变	氨基酸突变	DDG 值
<i>higA</i>	GCA→TCA	Ala 149 Ser	0.12
	GCA→TCA	Leu 111 Arg	-1.26
<i>higB</i>	GAC→GAG	Asp 30 Glu	-0.29
	GTG→GGG	Val 1 Gly	-2.72
<i>Rv1957</i>	GAC→GAG	Asp 147 Glu	-0.75
	GCG→GTG	Ala 81 Val	-1.93

讨 论

结核分枝杆菌的 TAC 系统是由 3 个基因 *Rv1955*、*Rv1956* 和 *Rv1957* 共同编码,分别编码毒素蛋白 HigB、抗毒素蛋白 HigA 和分子伴侣 Rv1957。基因 *Rv1957* 编码一个类似大肠埃希菌中 *secB* 的伴侣蛋白,该分子伴侣协助 HigA 抗毒素蛋白的正确折叠^[9],从而阻止抗毒素蛋白被 ClpC1 等蛋白酶降解,这种相互作用有利于抗毒素蛋白 HigA 中和毒素蛋白 HigB。当细菌遭遇环境压力(缺氧、饥饿等)时,毒素蛋白 HigB 被激活,通过切割 RNA 酶,最终导致细菌程序性死亡或进入生长抑制状态^[10]。在不利的生长压力下,细菌是死亡还是进入持留状态,可能取决于 TAs 的类型及毒素蛋白暴露的时间。有学者认为 TAs 可作为治疗结核病的新药物靶点,即通过抑制抗毒素的表达,使大量的毒素蛋白聚集,从而杀死细胞^[11]。

对于同义密码子,不同生物的使用频率有很大差异,并影响其转化效率^[12],目前已知晓结核分枝杆菌优先使用不同的氨基酸密码子。在 138 株北京型菌株中,存在两种不同类型的同义碱基替换,因此,本研究分析了 TAC 系统中同义替换的氨基酸密码子的使用情况。编码组氨酸(His)的野生型密码子使用频率为 1.49,突变后的密码子 CAT 使用频率降为 0.51;编码亮氨酸(Leu)的野生型密码子使用频率为 3.44,突变后的密码子 TTG 使用频率降为 1.06,这些偏爱密码子的改变可能会影响蛋白的表达。

183 株菌有 149 株(81.42%)发生突变,其中有 138 株(92.62%)属于北京家族。本研究发现 TAC 系统中的突变,特别是异义核苷酸的改变,均造成相应氨基酸的改变,进而可能影响蛋白产物的表达。有 31 株菌发生异义核苷酸改变,占有菌株的

16.94%,其中64.52%(20/31)的菌株属于北京家族。在6个异义突变中,预测有4个对蛋白的影响较大,有3个仅发生在北京家族菌株中。研究中发现北京家族菌株的TAC系统与非北京家族相比,具有更高的基因多态性。已有研究表明北京家族菌株作为优势菌株,更易传播,易致病,易耐药^[13-14]。北京基因型菌株在*Rv3908*,*mutT2*和*ogt*三种公认的DNA突变修复基因上表现出独特的错义突变,这些突变可导致细菌突变频率增加,部分地解释了北京家族菌株快速适应环境的能力^[15]。TAC系统作为一个毒力基因,在本研究中发现北京家族呈现更高的多态性水平,这可能更有利于结核分枝杆菌北京家族菌株适应不同的宿主环境。此外*higA*(*Rv1956*)基因序列比对发现,所有的北京家族菌株在第121位的组氨酸(His)存在特异性的CAC121CAT突变,这个特异性的SNP位点可以被用来鉴别北京型家族和非北京家族菌株。

TAs参与细菌的持留,而持留菌的特征之一即对药物不敏感。本文对TAC系统基因与耐药表型之间的关系进行了探索,在组成TAC系统的3个基因中,仅编码抗毒素蛋白HigA的基因多态性可能与耐药表型相关。位于*higA*基因的CAC121CAT突变位点在耐SM和耐RFP菌株中的突变频率高于敏感株,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。结核分枝杆菌耐SM和RFP可能与*higA*(*Rv1956*)基因突变有关,且CAC121CAT突变位点是北京基因型的特异性突变位点,由此推论北京基因型菌株可能更易耐药。

综上所述,结核分枝杆菌TAC系统的基因多态性的研究为全面了解结核分枝杆菌的致病性、基因结构与功能及其分子演化奠定基础。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Gomez JE, McKinney JD. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance [J]. Tuberculosis, 2004, 84 (1/2): 29-44. DOI: 10.1016/j.tube.2003.08.003.
- [2] Kondratieva T, Azhikina T, Nikonenko B, et al. Latent tuberculosis infection: What we know about its genetic control? [J]. Tuberculosis, 2014, 94 (5): 462-468. DOI: 10.1016/j.tube.2014.06.009.
- [3] Ahidjo BA, Kuhnert D, McKenzie JL, et al. VapC toxins from *Mycobacterium tuberculosis* are ribonucleases that differentially inhibit growth and are neutralized by cognate VapB antitoxins [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21738. DOI: 10.1371/journal.pone.0021738.
- [4] Hayes F. Toxins-antitoxins: Plasmid maintenance, programmed

cell death, and cell cycle arrest [J]. Science, 2003, 301 (5639): 1496-1499. DOI: 10.1126/science.1088157.

- [5] Ramage HR, Connolly LE, Cox JS. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: Implications for pathogenesis, stress responses, and evolution [J]. PLoS Genet, 2009, 5(12): e1000767. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000767.
- [6] Sala A, Calderon V, Bordes P, et al. TAC from *Mycobacterium tuberculosis*: a paradigm for stress-responsive toxin-antitoxin systems controlled by SecB-like chaperones [J]. Cell Stress Chaperones, 2013, 18(2): 129-135. DOI: 10.1007/s12192-012-0396-5.
- [7] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(4): 907-914.
- [8] Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. I-Mutant 2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33 Suppl 2: W306-W310. DOI: 10.1093/nar/gki375.
- [9] Bordes P, Cirinesi AM, Ummels R, et al. SecB-like chaperone controls a toxin-antitoxin stress-responsive system in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(20): 8438-8443. DOI: 10.1073/pnas.1101189108.
- [10] Schuessler DL, Cortes T, Fivian-Hughes AS, et al. Induced ectopic expression of HigB toxin in *Mycobacterium tuberculosis* results in growth inhibition, reduced abundance of a subset of mRNAs and cleavage of tmRNA [J]. Mol Microbiol, 2013, 90(1): 195-207. DOI: 10.1111/mmi.12358.
- [11] Demidenok OI, Goncharenko AV. Bacterial toxin-antitoxin systems and perspectives for their application in medicine: a review [J]. Appl Biochem Microbiol, 2013, 49(6): 535-541. DOI: 10.1134/S0003683813060070.
- [12] Andersson GE, Sharp PM. Codon usage in the *Mycobacterium tuberculosis* complex [J]. Microbiology, 1996, 142 (Pt 4): 915-925. DOI: 10.1099/00221287-142-4-915.
- [13] Aguilar D, Hanekom M, Mata D, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission [J]. Tuberculosis, 2010, 90(5): 319-325. DOI: 10.1016/j.tube.2010.08.004.
- [14] van der Spuy GD, Kremer K, Ndabambi SL, et al. Changing *Mycobacterium tuberculosis* population highlights clade-specific pathogenic characteristics [J]. Tuberculosis, 2009, 89(2): 120-125. DOI: 10.1016/j.tube.2008.09.003.
- [15] Ebrahimi-Rad M, Bifani P, Martin C, et al. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(7): 838-845. DOI: 10.3201/eid0907.020803.

(收稿日期:2015-11-13)

(本文编辑:张林东)