

# 应用膜反向斑点杂交技术快速检测结核分支杆菌 耐乙胺丁醇基因型的研究

梁建琴 吴雪琼 曹立雪 李洪敏 张俊仙

(解放军第三零九医院结核病研究室 北京 100091)

**摘 要** 应用膜反向斑点杂交技术快速检测结核分支杆菌对乙胺丁醇(EMB)耐药性。设计与合成用于检测结核分支杆菌耐 EMB 基因 *embB* 的寡核苷酸探针,点于硝酸纤维素膜上,与结核分支杆菌临床分离株生物素标记的聚合酶链反应(PCR)产物进行反向斑点杂交,并与 PCR-单链构象多态性(PCR-SSCP)和 PCR-直接测序(PCR-DS)结果比较。对 81 株结核分支杆菌临床分离株进行分析,31 株 EMB 敏感株中,26 株 *embB* 基因的 SSCP 图谱、膜反向斑点杂交结果与标准株(H37Rv)完全相同;其余 5 株 SSCP 图谱出现泳动变位,其中 3 株 E1b 杂交阳性,PCR-DS 分析为 *embB* 基因 306 位密码子 ATG→GTG 突变,2 株 E1d 杂交阳性,PCR-DS 分析为 *embB* 基因 306 位密码子 ATG→ATA 突变。50 株耐 EMB 菌株中,24 株 PCR-SSCP 图谱与标准菌株相同,1 株杂交阳性,26 株 PCR-SSCP 图谱出现泳动变位,其中 18 株 E1b 杂交阳性,2 株 E1c 杂交阳性,5 株 E1d 杂交阳性,1 株 E1e 杂交阳性,未发现 E1f 杂交阳性,与 PCR-SSCP、PCR-DS 分析结果一致。突变检出率为 52%。膜反向斑点杂交技术可能成为检测部分结核分支杆菌乙胺丁醇耐药基因型简便、快速的方法。

**关键词** 结核分支杆菌,乙胺丁醇,*embB* 基因,药物耐受性,膜反向斑点杂交

中图分类号:Q789 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)02-0215-05

结核分支杆菌的耐药性一直是结核病治疗中的棘手问题,许多感染了耐药结核分支杆菌尤其是耐多药结核分支杆菌的患者,都因缺乏及时的诊断和治疗而使病情加重甚至死亡。选择敏感的抗结核药物,合理地联合用药是结核病治疗成功的前提,准确而快速的药物敏感性检测方法的建立对结核病开展早期有效的化疗具有极其重要的意义。目前国内外采用传统方法进行分支杆菌药物敏感性试验,由于结核分支杆菌生长缓慢,在得到分离株后需 3~4 周方能获得结果。建立于 80 年代的 BACTEC-TB 460 快速培养系统,虽速度快(2~6d),但仪器设备昂贵,在有条件的实验室方可采用。近年来结核分支杆菌分子药敏试验新技术新方法层出不穷,如 DNA 序列测定、PCR-单链构象多态性(SSCP)分析、PCR-限制性片段长度多态性(RFLP)分析等大都通过凝胶分析,一次只能分析一个基因型,不能一次性检测多个耐药基因而限制其推广应用。本研究旨在应用膜反向斑点杂交技术快速检测结核分支杆菌对乙胺丁醇(EMB)的耐药性,为深入开展基因膜芯片技术在结核耐药性方面的研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

84 株分支杆菌临床分离株来自解放军 309 医院结核病研究中心临床实验室。耐药菌株(R)均为包括耐 EMB 的耐多药分离株;敏感菌株(S)为不耐 EMB 的临床分离株。标准菌株 H37Rv 由中国药品生物制品鉴定所提供。硝酸纤维素膜购自基因有限公司,孔径为 0.2  $\mu\text{m}$ 。

### 1.2 方法

**1.2.1 结核分支杆菌 DNA 提取** 采用解放军第 309 医院结核病研究室分支杆菌 DNA 提取方法<sup>[1]</sup>。

**1.2.2 引物的设计、合成和标记** 引物由上海生物工程技术有限公司合成、纯化。引物 E6 5' 端用生物素标记。引物 E6 和 E7 可扩增结核分支杆菌 *embB* 基因,产生 258bp 片段;引物 16S1 和 16S2 可扩增分支杆菌 16S rRNA 272bp 片段。

**1.2.3 PCR 扩增** 采用解放军第 309 医院结核病研究室结核杆菌 PCR 扩增试剂盒<sup>[1]</sup>。

**1.2.4 探针的设计和合成** 根据文献[2]设计 E1、

基金项目:军队医学杰出中青年人才科研基金项目(01J020)

作者简介:梁建琴(1966-),女,河北省石家庄市人,副主任医师,博士研究生。主要从事分支杆菌菌种鉴定和结核分支杆菌耐药基因的研究。Tel:86-10-66775675 E-mail:ljqb@eyou.com

收稿日期:2003-06-23,修回日期:2003-11-24

E1b、E1c、E1d、E1e 和 E1f 探针用于检测 *embB* 基因 306 位密码子突变 ,E1 为野生型 ,E1b 为 ATG→GTG 突变型 ,E1c 为 ATG→CTG 突变型 ,E1d 为 ATG→ATA 突变型 ,E1e 为 ATG→ATT 突变型 ,E1f 为 ATG→ATC 突变型。探针由上海生工生物工程技术有限公司合成。

**1.2.5 杂交膜的制备** :将硝酸纤维膜浸入  $2 \times \text{SSC}$  中预处理 30min , $37^\circ\text{C}$  烘干 ,各取  $1 \mu\text{L}$  加尾探针 E1、E1b、E1c、E1d、E1e 和 E1f 点于同一张预处理后的膜上 , $60^\circ\text{C}$  烘烤 1~2h ,用水简单漂洗 ,晾干备用。

**1.2.6 膜杂交结果判读** :以结核分支杆菌标准菌株 H37Rv 为对照 ,用生物素标记的扩增产物分别与处理后的膜杂交。(1)预杂交 :将杂交液和处理后的膜装入杂交袋中 , $37^\circ\text{C}$  水浴 30min (2)杂交 :向杂交袋中加入变性的生物素标记 PCR 扩增产物 , $37^\circ\text{C}$  水浴 30min (3)洗膜 : $2 \times \text{SSC}$ -0.1% SDS 室温洗膜 10min , $0.2 \times \text{SSC}$ -0.1% SDS 室温洗膜 10min (4)加酶 :用 1:1000 的链亲和素-碱性磷酸酶 (SA-AP)与膜在  $37^\circ\text{C}$  水浴 30min (5)洗膜 :洗液 I ( $100\text{mol/L}$  Tris-HCl , $150\text{mmol/L}$  NaCl , $2\text{mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$  ,0.05% TritonX-100 , $\text{pH}7.5$ )室温洗膜 10min ,洗液 II ( $100\text{mol/L}$  Tris-HCl , $150\text{mmol/L}$  NaCl , $1\text{mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$  , $\text{pH}9.5$ )室温洗膜 10min (6)显色 :每 mL 洗液 II 加入 NBT  $6.6\mu\text{L}$  ,BICP  $3.3\mu\text{L}$  混匀 ,将配好的显色液加入杂交袋中 ,闭光显色 10min ,据信号强弱肉眼判读结果。若野生型探针的杂交信号远远强于其它突变型探针 ,说明该位点无突变发生 ,若突变型探针的杂交信号远远强于野生型探针 ,则说明该位点发生了相应的突变。

**1.2.7 PCR-SSCP 分支杆菌菌种初步鉴定**<sup>[3,4]</sup> :扩增的分支杆菌 16S rRNA 272bp 片段 ,在 8%(29:1)非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳 ,与结核分支杆菌 H37Rv 图谱相同的为结核分支杆菌 ,不同的分离株为非结核分支杆菌。

**1.2.8 PCR-SSCP 分析** :未标记的 *embB* 基因的 PCR 扩增产物 8%(29:1)非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 ,银染后观察结果并照相。与结核分支杆菌标准菌株图谱相同的为野生型 ,出现泳动变位的为突变型。

**1.2.9 PCR-DS 分析** :部分经 PCR-SSCP 和膜杂交分析为 *embB* 基因突变的临床分离株进一步由上海生工生物工程技术有限公司进行 DNA 测序证实。

## 2 结果

### 2.1 16S rRNA PCR-SSCP 分支杆菌菌种初步鉴定

84 株临床分离株经 16S rRNA PCR-SSCP 初步菌

种鉴定 ,81 株为结核分支杆菌 ,3 株为非结核分支杆菌。部分结果见图 1。

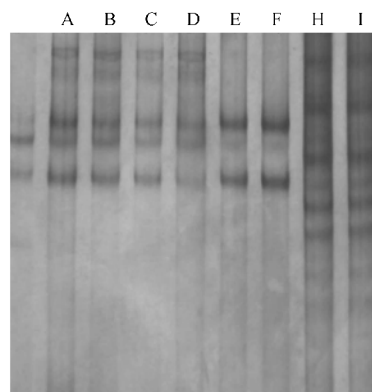


图 1 分支杆菌 16S rRNA PCR-SSCP 菌种鉴定部分结果

Fig. 1 The partial result of identified *Mycobacterium* species by 16S rRNA PCR-SSCP

A ,B ,D ,E ,F. *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates ;  
C. *Mycobacterium tuberculosis* standard strain H37Rv ;  
H ,I. Non-tuberculous *Mycobacterium* clinical isolates .

### 2.2 结核分支杆菌 *embB* 基因 PCR 扩增

50 株结核分支杆菌耐 EMB 分离株和 31 株 EMB 敏感株分别用标记和未标记的 E6 和 E7 引物扩增。

### 2.3 *embB* 基因 PCR-SSCP 分析

以结核分支杆菌标准菌株 H37Rv 为对照 ,对未标记的 81 株结核分支杆菌临床分离株 *embB* 基因扩增产物进行 SSCP 分析 ,结果 31 株 EMB 敏感株中 ,26 株 *embB* 基因的 SSCP 图谱与结核分支杆菌标准菌株完全一致 ,5 株 *embB* 基因的 SSCP 图谱出现泳动变位 ;50 株传统药敏试验耐 EMB 菌株中 ,26 株 *embB* 基因 SSCP 图谱与标准株不同 ,呈现 4 种变异

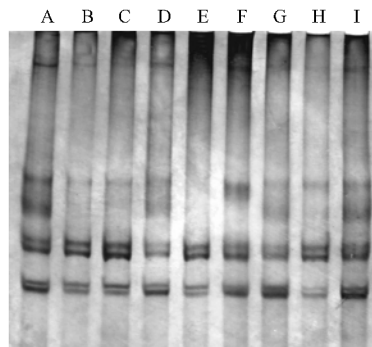


图 2 结核分支杆菌 *embB* 基因 PCR-SSCP 分析结果

Fig. 2 The result of *embB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* by PCR-SSCP

A ,G. Ethambutol-sensitive clinical isolates ,SSCP spectrum was normal ;  
B ,C ,E ,F ,H. Ethambutol-resistant clinical isolates ,SSCP spectrum was abnormal ;  
D. *Mycobacterium tuberculosis* standard strain H37Rv ;  
I. Ethambutol-resistant clinical isolates ,SSCP spectrum was normal .

图谱类型 24 株与敏感株相同 ,突变检出率为 52% ;部分结果见图 2。

2.4 膜杂交结果分析

根据杂交信号强弱判读膜杂交结果显示 31 株 EMB 敏感株中 26 株出现 E1 探针杂交阳性 3 株出现 E1b 探针杂交阳性 2 株出现 E1d 探针杂交阳性 ;

50 株耐 EMB 菌株中 18 株出现 E1b 探针杂交阳性 ,5 株出现 E1d 探针杂交阳性 2 株出现 E1c 探针杂交阳性 1 株出现 E1e 探针杂交阳性 ,未发现 E1f 探针杂交阳性 24 株出现 E1 探针杂交阳性 ,为 *embB* 基因野生型。与 PCR-SSCP 结果完全吻合 ,一致性为 100%。部分结果见图 3。

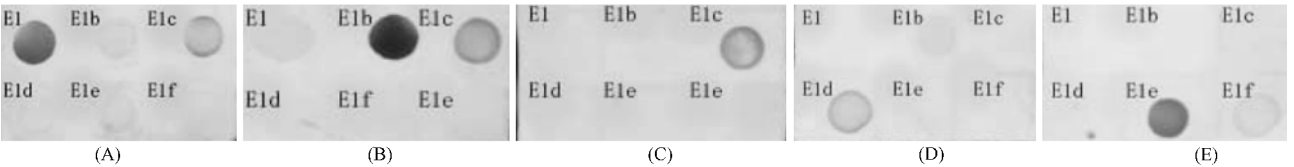


图 3 结核分支杆菌 *embB* 基因 PCR-膜杂交分析结果

Fig. 3 The result analysis of *embB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* by PCR-membrane hybridization  
(A) Ethambutol-sensitive clinical isolates were positive hybridization with probe E1 ,E1 was wild type of *embB* ;  
(B) Ethambutol-resistant clinical isolates were positive hybridization with probe E1b ,E1b was ATG→GTG mutant type at codon 306 of *embB* ;  
(C) Ethambutol-resistant clinical isolates were positive hybridization with probe E1c ,E1c was ATG→CTG mutate type at codon 306 of *embB* ;  
(D) Ethambutol-resistant clinical isolates were positive hybridization with probe E1d ,E1d was ATG→ATA mutate type at codon 306 of *embB* ;  
(E) Ethambutol-resistant clinical isolates were positive hybridization with probe E1e ,E1e was ATG→ATT mutate type at codon 306 of *embB* , E1f was ATG→ATC mutate type at codon 306 of *embB* .

2.5 PCR-DS 分析

部分经 PCR-SSCP 和膜杂交分析为 *embB* 基因突变的临床分离株进一步由上海生工生物工程技术服务有限公司进行 DNA 测序证实(见表 1)。

表 1 膜反向斑点杂交、PCR-SSCP 和 PCR-DS 分析结果

EMB conventional drug sensitivity test	PCR-SSCP <i>embB</i>	PCR-DS <i>embB</i> ( codon306 )	PCR-membrane hybridization <i>embB</i>	Strain numbers
S	-	Not tested	E1( + )	26
S	+	ATG→GTG	E1b( + )	3
S	+	ATG→ATA	E1d( + )	2
R	-	-	E1( + )	24
R	+	ATG→GTG	E1b( + )	18
R	+	ATG→CTG	E1c( + )	2
R	+	ATG→ATA	E1d( + )	5
R	+	ATG→ATT	E1e( + )	1

+ .PCR-SSCP spectrum was abnormal or hybridization was positive ; - .PCR-SSCP spectrum was normal or no-mutation ; S. Sensitive strains ;R. Resistant strains .

3 讨论

近年来国内外学者在基因水平上对引起结核分支杆菌耐药的突变基因作了详尽的研究。结核分支杆菌耐药性检测方法也不断涌现 ,其中最方便价廉的方法首推 PCR-SSCP ,但由于其依赖凝胶电泳 ,且每次电泳只能检测少数几个样本的一种突变基因 ,如果同时检测 5 种常用一线抗结核药物的耐药情况 ,工作量较大 ,获得的信息量小。

膜反向斑点杂交技术是一种建立于 PCR 基础

上的反向杂交方法。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 ,将 PCR 产物变性后与固定在膜上的特异寡核苷酸探针杂交 ,通过观察斑点杂交信号强弱判读结果。Rossau<sup>[5]</sup>应用 Innogenetics 公司用于检测结核分支杆菌耐 RFP 基因型的试剂盒通过反向杂交试验检测 107 例已知 *rpob* 序列的结核分支杆菌分离株 4 种突变类型和 264 株通过传统药敏试验检测的临床分离株 ,未发现假阳性 ,检测灵敏度为 98% ,特异性为 100%。Hirano 等<sup>[6]</sup>则对 *mpb* 基因另 4 种突变位点

进行检测,突变检出率为 90%。2002 年王 文等<sup>[7]</sup>利用反向点杂交方法检测耐利福平结核分支杆菌 *rpoB* 基因突变,杂交结果与传统药敏试验结果和测序结果符合率为 28/34 和 30/34。但国内应用膜杂交技术检测耐 EMB 基因型的报道较少见。

EMB 是一种阿拉伯糖类类似物,是和异烟肼 (INH)、利福平 (RFP)、链霉素 (SM)、吡嗪酰胺 (PZA) 联合治疗结核病的一线抗结核药物,作用于靶分子阿拉伯糖基转移酶,抑制阿拉伯糖基聚合入阿拉伯半乳糖,从而影响了细菌细胞壁分支菌酸-阿拉伯半乳糖-肽聚糖复合物的形成,引起细菌细胞形态学改变,最终导致细菌死亡,同时也使靶分子在细胞内的药物(如 RFP)更容易进入细胞,因而 EMB 与 RFP 联合用于抗结核治疗时具有协同作用<sup>[8]</sup>。EMB 也被广泛用于治疗鸟分支杆菌、堪萨斯分支杆菌、蟾蜍分支杆菌、海分支杆菌和马尔摩分支杆菌感染,因此,它比 INH 的应用范围更广泛<sup>[9]</sup>。分支杆菌耐 EMB 与阿拉伯糖基转移酶的编码基因 *embCAB* 操纵子突变有关。Sreevatsan 等<sup>[2]</sup>报道 69% 结核分支杆菌耐 EMB 分离株有 *embB* 基因突变,其中 89% 又都发生于 306 位氨基酸密码子。*embB* 基因约 3246bp,编码糖基转移酶,*embB* 基因突变导致糖基转移酶结构改变,影响 EMB 和糖基转移酶的相互作用而产生耐药。我们通过 PCR-SSCP 和膜反向斑点杂交、PCR-DS 方法检测 26 株 EMB 敏感株与 H37Rv 菌株检测结果完全一致,其余 5 株 EMB 敏感株 SSCP 图谱出现泳动变位,其中 3 株 E1b 杂交阳性,PCR-DS 分析为 *embB* 基因 306 位密码子 ATG→GTG 突变,2 株 E1d 杂交阳性,PCR-DS 分析为 *embB* 基因 306 位密码子 ATG→ATA 突变,原因可能是传统药敏试验操作中存在人为因素如接种菌量、耐药或敏感标准的判定等所致;50 株耐 EMB 临床分离株,26 株存在 *embB* 基因 306 位密码子不同碱基突变,突变率为 52%,低于国外文献报道<sup>[2]</sup>。而吴雪琼等报道<sup>[10]</sup> 69 株耐 EMB 菌中,25 株为 306 位密码子不同碱基突变,其中 1 株合并 274 位 CGC→CCC 突变,*embB* 基因耐药突变率为 36.2%。本文分析的 *embB* 基因耐药突变率低于国外文献报道的原因,一方面可能是地域差异,另一方面可能是由于存在其它耐药机制所致。20 株传统耐药菌株,用膜斑点杂交技术和 PCR-DS 技术检测未发现研究部位基因变异,原因有可能是传统药敏试验操作中人为误差或存在其它耐药机制所造成。比如 Sreevatsan 等<sup>[2]</sup>报道在耐 EMB 分离株中可检测到 *embB* 285 位 TTC( Phe )→TTA

( Leu ) 330 位 TTC( Phe )→GTC( Val ) 630 位 ACC( Thr )→ATC( Ile )突变,以及 *embC* 基因 981 位 GTG( Val )→CTG( Leu )和 *embA* 5 位 GGT( Gly )→AGT( Ser )突变,Telenti 等<sup>[11]</sup>研究报道在两组耻垢分支杆菌突变株中,低水平耐药的突变株与 *emb* 表达增加有关,中等水平耐药的突变株一部分有 *embB*I303F 突变,而另一部分显示了表达水平的增加,这些均说明还有其它机制在结核分支杆菌耐 EMB 形成中起作用。

从理论上讲,把结核分支杆菌所有耐药基因的 PCR 扩增产物,与点在同一张硝酸纤维膜上的所有抗结核药物耐药基因相对应的探针进行杂交,那么一个临床标本的微量 DNA 就可以一次性、平行性检测该临床标本的所有耐药基因。从分析结果看,只要将 *embB* 基因 306 位密码子的野生型和已知突变型探针点于同一张硝酸纤维膜上,就可以检测到 50~60% 左右的耐 EMB 分离株。本文设计的探针数目较少,仅分析了 *embB* 基因 306 位密码子,只能检出大多数耐药突变株,因此,下一步我们将对 *embB* 基因其它突变位点和 *embA*、*embC* 基因常见突变位点进行进一步的研究,建立一种耐药检测新方法,弥补常规药敏试验的不足,指导临床治疗。

通过 PCR-膜反向斑点杂交技术快速鉴定部分结核分支杆菌耐 EMB 基因型,简便省时,为进一步研究结核分支杆菌对其他药物的耐药性鉴定奠定了基础。从 PCR 扩增到杂交结果判断仅需 1d,对指导临床医生及早准确用药非常有价值。

## 参 考 文 献

- [1] 张敦熔. 现代结核病学(第一版). 北京:人民军医出版社, 2000, 96-98.
- [2] Sreevatsan S, Stockbauer K E, Xi P, et al. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, **41**(8):1677-1681.
- [3] 吴雪琼, 张俊仙, 刘佳文, 等. PCR-SSCP 分支杆菌菌种初步鉴定方法的建立及其应用. 中国现代医学杂志, 2000, **10**(7): 25-26.
- [4] 李洪敏, 吴雪琼, 张俊仙, 等. 应用 PCR-SSCP 快速鉴定结核分支杆菌复合群. 微生物学通报, 2000, **27**(3): 202-204.
- [5] Rossau R, Traore H, Beenhouwer H D, 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): 2093-2098.
- [6] Hirano K, Abe C, Takahashi M. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. *J*

*Clin Microbiol* ,1999 **37** 2663 – 2666.

[ 7 ] 王 文,潘 卫,金维荣,等. 逆向点杂交方法检测耐利福平结核分支杆菌 *rpoB* 基因突变. 中华结核和呼吸杂志 ,2002 **25** ( 10 ) 591 – 594.

[ 8 ] Heifets L B . Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infection. CRC Press ,Inc Boca Raton Fla. 1991 ,179 – 199.

[ 9 ] Belanger A E ,Besra G S ,Ford M E ,et al. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 , **93** :11919 – 11924.

[ 10 ] 吴雪琼,梁建琴,李洪敏,等. 结核分支杆菌耐乙胺丁醇分子机制的研究. 中国抗生素杂志 ,2002 **27** ( 1 ) 49 – 54.

[ 11 ] Telenti A ,Philipp W J ,Sreevatsan S ,et al. The *emb* operon ,a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature Med* ,1997 **3** 567 – 570.

# Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Ethambutol-resistant Genes by Membrane-reverse Dot Blot Hybridization

LIANG Jian-Qin \*    WU Xue-Qiong    CAO Li-Xue    LI Hong-Min    ZHANG Jun-Xian  
( Tuberculosis Research Laboratory , The 309th Hospital of PLA , Beijing 100091 , China )

**Abstract :** To study the rapid detection of resistance to ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis* by reverse dot blot hybridized technique. We prepared the oligonucleotide probes of ethambutol-resistant genes ( *embB* ) and drop it on pyroxylin membrane. The target DNA fragments of *M. tuberculosis* clinical isolates were labeled with biotin by PCR amplification , and then hybridized with oligonucleotide probes on membrane. Polymerase chain reaction-Single stranded conformation polymorphism ( PCR-SSCP ) and PCR-direct sequencing ( PCR-DS ) techniques were used as the control. The *embB* gene in 81 *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates were analyzed. Of 31 ethambutol-sensitive strains , the results of SSCP spectrum and membrane hybridization in 26 sensitive strains were similar to H37Rv and positive hybridization with E1 , the SSCP spectrum in another five strains was different from that of H37Rv , 3 strains were positive hybridization with E1b , PCR-DS showed the ATG→GTG mutation at codon 306 of *embB* , 2 strains were positive in E1d , PCR-DS showed the ATG→ATA mutation. Of 50 ethambutol-resistant strains , 24 strains were positive hybridization with probe E1 as H37Rv ; 18 strains were positive hybridization with probe E1b , 2 strains were hybridized with probe E1c , 5 strains were hybridized with E1d , 1 strains were hybridized with E1e , all strains were negative hybridization with E1f. Mutation rate was 52% . The results coincided with PCR-SSCP and PCR-DS. The membrane-reverse dot blot hybridized technique was simple and rapid and could be used to detect ethambutol-resistance of partial *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains.

**Key words :** *Mycobacterium tuberculosis* , Ethambutol , *embB* , Drug resistance , Reverse dot blot hybridization

Foundation item Project Granted by Science Research Foundation of Outstanding Youth of Military Medical Science( 01J020 )

\* Corresponding author. Tel 86-10-66775675 E-mail :ljqb@eyou.com

Received date 06-23-2003