

结核分支杆菌链霉素耐药快速检测

吴为群¹, 谢灿茂¹, 严英硕¹, 方建民², 容中生¹

(中山大学 1. 附属第一医院呼吸内科, 2. 中山医学院病原微生物教研室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)方法快速诊断结核分支杆菌链霉素(Sm)耐药的临床意义。【方法】用 PCR-SSCP 技术检测了 30 株 Sm 敏感的结核分支杆菌临床分离株, 30 株 Sm 耐药的临床分离株, 以结核分支杆菌 H₃₇RV 标准株作对照。先用 PCR 方法扩增 rpsL 基因, 随后用 SSCP 方法鉴定其扩增产物有无突变。【结果】所有临床分离株均观察到 rpsL 基因 PCR 扩增产物。30 株 Sm 敏感的临床分离株与 H₃₇RV 标准株呈现一样 SSCP 泳动条带, 30 株 Sm 耐药株中 19 株有 rpsL 基因泳动异常, 提示约有 63% Sm 耐药菌株有 rpsL 基因突变。【结论】本研究提示用 SSCP 方法容易鉴定出 rpsL 基因的点突变, PCR-SSCP 技术可作为快速鉴定结核分支杆菌 Sm 敏感性的有用工具, 对结核分支杆菌 Sm 耐药的快速诊断有较大价值。

关键词: 链霉素; 药物耐受; 结核杆菌; 聚合酶链反应; 单链构象多态性

中图分类号: R52 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2002)5S-0055-02

最近全国结核病流行病学调查, 显示我国结核病疫情仍较严重, 呈三高一低现象, 即患病率高、耐药率高、死亡率高, 年递降低。其中结核病耐药率高是造成结核病疫情下降缓慢的重要原因之一^[1]。传统的结核分支杆菌药敏试验费时长(3~8 周), 往往延误病人的诊治。随着分子生物学技术的快速发展, 使用分子生物学方法快速检测结核分支杆菌的耐药性成为可能。故有必要建立快速鉴定结核分支杆菌耐药性的分子检测方法, 以指导耐药结核病的诊断、化疗和管理, 防止耐药菌株的播散^[2]。链霉素(Sm)是临床常用的一线抗结核药物, 多年以来 Sm 耐药发生率一直处于较高水平。研究表明结核分支杆菌耐 Sm 是由于其核糖体蛋白 S12 编码基因(rpsL)和/或 16S rRNA 编码基因(rrs)突变所致。本研究采用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)分析方法, 快速检测结核分支杆菌的 rpsL 基因突变, 旨在探讨用 PCR-SSCP 方法快速准确诊断结核分支杆菌 Sm 耐药的临床意义。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源

结核杆菌 H₃₇RV 标准株来源于原中山医科大学微生物教研室, 结核分支杆菌临床分离株来源于广州市胸科医院和广州市结核病防治所。结核分支杆菌用 BACTEC TB460 培养系统培养和进行药敏试验。选择 60 株临床分离株包括 30 株 Sm 敏感的菌株和 30 株 Sm 耐药的菌株进行研究。

1.2 DNA 制备

DNA 抽提采用传统的方法^[2]。取 1.5 mL BACTEC 培养液高速离心 10 min(12 000 g), 弃上清, 沉淀物用 2 mL 生理盐水洗涤。沉淀悬浮于 400 μL 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 1 g/L 溶菌酶), 37 °C 水浴 90 min, 再加入 1 g/L 蛋白酶 K 和 1% SDS, 56 °C 水浴 3 h。DNA 抽提用苯酚氯仿法。DNA 用消毒双蒸水溶解, 保留在 -30 °C 冰箱待扩增。

1.3 PCR 扩增

选用引物 IS1(5'-CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG-

3'), IS2(5'-CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3')扩增结核杆菌保守片段 IS 6110, 产生 123 bp 片段。扩增 rpsL 基因用引物 ML51(5'-CCC ACC ATT CAG CAG CTG GT-3')和 ML52(5'-GTC GAG CGA ACC GCG AAT GA-3'), PCR 反应液(50 μL)含 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dATP, dTTP, dGTP 和 dCTP, 2 μL DNA 模板, 0.5 μmol/L 引物。预变性后加入 1.25 U Taq 酶。使用 PE 2400 扩增仪, 扩增条件为 95 °C 预变性 5 min, 随后 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min 共扩增 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min。取 10 μL PCR 反应液行 20 g/L 琼脂糖电泳, 若有 306 bp 条带存在提示基因扩增成功。为除外交叉感染, 每次试验都设置阴性对照。

1.4 SSCP 分析^[3]

取 2 μL PCR 扩增产物加入 8 μL 凝胶上样缓冲液(含 95% 甲酰胺), 混匀, 98 °C 水浴 10 min, 再迅速置入冰水中冷却 10 min, 加样于非变性聚丙烯酰胺凝胶。于恒压下 10 °C 电泳 12~16 h。凝胶中 DNA 片段以银染色法显色。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

以结核分支杆菌标准株(H₃₇RV)DNA 为对照, 用引物 IS1、IS2 扩增上述 60 株结核分支杆菌分离株, 均产生 123 bp 片段, 证实这些分离株均为结核分支杆菌。随后, 上述 60 株分离株均用引物 ML51 和 ML52 扩增。若 PCR 产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶上呈现一个清晰的 306 bp 条带(见图 1), 说明 rpsL 基因片段扩增成功。所有 60 株结核分支杆菌分离株均产生 306 bp 条带, 进一步证实这些分离株均为结核分支杆菌, 且其 rpsL 基因片段均成功扩增。

2.2 SSCP 分析结果

以结核分支杆菌标准株(H₃₇RV)rpsL 基因扩增产物作为对照, 60 株分离株的 rpsL 基因扩增产物经 SSCP 分析发现, 30 株 Sm 敏感株两条单链 DNA 带泳动正常; 30 株 Sm 耐药株中 19 株显示有不同的 SSCP 带谱, 存在泳动异常, 另 11

收稿日期: 2002-06-19

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(950335)

作者简介: 吴为群(1964-), 男, 江西新余人, 医学博士, 副教授。

株耐药株 SSCP 带谱无异常(见图 2)。提示约有 63%(19/30) Sm 耐药菌株有 rpsL 基因突变。



图1 rpsL基因 PCR 产物的琼脂糖电泳图(EB 染色)

条带 1 为阴性对照; 条带 2 为结核分支杆菌标准株(H₃₇RV); 条带 3 为 Sm 敏感临床分离株; 条带 4、5 为 Sm 耐药临床分离株; 条带 6 为 100 bp DNA ladder



图2 PCR-SSCP 图谱

条带 1 为结核分支杆菌标准株(H₃₇RV); 条带 2、3 为 Sm 敏感临床分离株; 条带 4、5、6 为 Sm 耐药临床分离株

3 讨论

结核分支杆菌获得耐药性的方式与多数细菌相似, 大致有 3 种类型, 既障碍机制(降低细胞膜的通透性和外排泵机制), 产生灭活酶(如 β -内酰胺酶), 药物靶位的改变(如某个关键基因的突变)。但结核分支杆菌细胞壁对多数药物的通透性低, 且易产生诸如 β -内酰胺酶的降解酶类和其它药物修饰酶。因此, 结核杆菌对常见抗生素天然耐药。结核分支杆菌与其它致病菌的最显著差别在于结核杆菌不存在质粒, 无法通过质粒的介导获得耐药性, 染色体介导的耐药性是结核分支杆菌产生耐药的主要形式^[4]。

链霉素是抗结核治疗中常用的氨基糖苷类抗生素。Sm 主要作用于结核分支杆菌的核糖体, 诱导遗传密码的错误, 抑制 mRNA 转译的开始, 干扰转译过程中的校对, 从而抑制蛋白质合成^[5]。Sm 在全国历次结核病流行病学调查中始终居于耐药的前 2 位, 2000 年全国第四次流调 Sm 耐药率达 17.3%, 提示临床结核分支杆菌 Sm 耐药率仍较高, 应引起重视^[1]。研究发现 Sm 耐药与编码核糖体的 2 个基因发生突变有关, 它们是编码 S12 蛋白的 rpsL 基因和编码 16S rRNA 的 rrs 基因。rpsL 基因是主要突变位点, 其中密码子 43 最常见, 密码子 88 较罕见。16S rRNA 的环状结构为次要突变点, 即 491、513、516、903 核苷酸位点上^[3,4]。核糖体

蛋白 S12 的正常作用可能是维持读码过程中的一些轻微的不准确性, rpsL 基因突变就会导致 S12 蛋白改变, 从而严格要求核糖体只使用与每一密码对应的氨酰 tRNA, 更准确地表达 mRNA 的每一个密码, 抑制了 Sm 诱导的遗传密码错误而产生耐药性^[3,4]。Morris 等^[6]报道 44 株 Sm 耐药株 25 株有 rpsL 基因突变, 7 株有 rrs 基因突变, 12 株两个基因均未发现异常。Heym 等^[7]用 PCR-SSCP 和 DNA 测序的方法, 发现 25 株 Sm 耐药株中分别有 13 株、2 株 rpsL 和 rrs 基因有改变。本研究 30 株 Sm 耐药株中 19 株 SSCP 带谱存在泳动异常, SSCP 分析提示约有 63% Sm 耐药菌株显示有 rpsL 基因突变。本文结果与上述研究^[6,7]结果类似, 提示 rpsL 基因突变是 Sm 耐药的主要机理。

PCR-SSCP 方法是近几年来广泛使用的鉴定基因突变的筛选技术, 是检测碱基置换或缺失的可靠方法。与直接 DNA 测序相比, PCR-SSCP 是一种简单、便宜的检测基因突变的方法, 且其特异性较高^[5-8]。本研究应用 PCR-SSCP 方法检测, 发现 Sm 敏感株和耐药株 rpsL 基因扩增产物作 SSCP 分析时带谱有明显不同, 通过 SSCP 方法较易发现 rpsL 基因的点突变。测序结果也证实 PCR-SSCP 是检测基因突变的简单且可靠的方法^[6,7]。

因此, PCR-SSCP 分析方法可作为快速鉴定结核分支杆菌 Sm 敏感性的一种有效工具, 对耐药结核病的诊治工作有较大价值。

(致谢: 广州市胸科医院吴龙章主任和广州市结核病防治所刘志辉主任在提供结核分支杆菌菌株方面给予的帮助)

参考文献:

- [1] 刘宇红, 姜广路, 赵立平, 等. 第四次全国结核病流行病学抽样调查-结核分支杆菌耐药性分析与评价[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(4): 224.
- [2] Ouerol J M, Farga M A, Granda D, et al. The utility of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis [J]. Chest, 1995, 107(6): 1631.
- [3] 吴雪琼, 庄玉辉, 何秀云, 等. 结核分支杆菌链霉素耐药基因的检测[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1996, 19(6): 342.
- [4] 乐军. 结核杆菌耐药分子机理的研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1999, 20(2): 76.
- [5] Honore N, Cole S T. Streptomycin resistance in mycobacteria [J]. Antimicrob. Agents Chemother. 1994, 38(2): 238.
- [6] Morris S, Bai G H, Suffys P, et al. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis [J]. JID, 1995, 171(4): 954.
- [7] Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, et al. Implication of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis; a molecular study [J]. Lancet, 1994, 344 (8918): 293.
- [8] 吴本权, 唐英春, 张扣兴, 等. M-RSA PBP 2 α 表达的影响因素及 MecA 基因的检测价值[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 157.

(编辑 刘清海)