

# 基于 PARMs 技术的结核分枝杆菌利福平耐药基因 *rpoB* 分子标记的开发

刘晓慧<sup>1</sup>, 祖向阳<sup>1</sup>, 王珍珍<sup>2</sup>, 赵朋超<sup>1</sup>, 高蕾<sup>1</sup>, 赵战勤<sup>3</sup>, 薛云<sup>1</sup>

1 河南科技大学 医学技术与工程学院, 河南 洛阳 471023

2 河南科技大学第一附属医院检验科, 河南 洛阳 471023

3 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471023

刘晓慧, 祖向阳, 王珍珍, 等. 基于 PARMs 技术的结核分枝杆菌利福平耐药基因 *rpoB* 分子标记的开发. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2503-2512.

Liu XH, Zu XY, Wang ZZ, et al. Development of molecular markers of *Mycobacterium tuberculosis* rifampicin resistance gene *rpoB* by PARMs technology. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2503-2512.

**摘要:** 文中旨在建立结核分枝杆菌利福平耐药基因 *rpoB* 的荧光分子标记, 为分子药物敏感性试验提供简便、可靠的基因分型检测方法。对比分析利福平耐药菌株 *rpoB* 基因 531、526、516、511、513 等氨基酸位点的基因突变与敏感菌株中等位基因的序列差异, 结合 PARMs 技术 (Penta-primer amplification refractory mutation system), 建立 *rpoB* 基因的荧光分子标记。利用其对 104 例结核分枝杆菌临床分离株进行检测, 经 Sanger 测序验证, 正确率 100%。并采用比例法药敏试验对这 104 份样本进行了利福平耐药性鉴定, 与分子标记结果相符率为 94.23%。结果表明, 分子标记有较强可靠性, 能检出表型药敏无法测出的低浓度耐药样本 (511/533 单位点突变)。建立的 11 组荧光分子标记能覆盖 92%–96% 的利福平耐药菌株 *rpoB* 基因突变类型, 为快速检测结核分枝杆菌利福平耐药提供新思路。

**关键词:** 结核分枝杆菌, 利福平耐药, *rpoB* 基因, PARMs 技术, 比例法药敏

**Received:** August 7, 2020; **Accepted:** October 19, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31672530, 32072899, U1704117), Key Research and Development and Promotion Projects in Henan Province, China (No. 192102310037), Graduate Innovation Fund of Henan University of Science and Technology (No. CXJJ-2019KJ04).

**Corresponding authors:** Yun Xue. Tel: +86-379-64593822; E-mail: xueyun6688@163.com

Zhanqin Zhao. Tel: +86-379-64282051; E-mail: zhaozhanqin@163.com

国家自然科学基金 (Nos. 31672530, 32072899, U1704117), 河南省科技攻关项目 (No. 192102310037), 河南科技大学研究生创新基金 (No. CXJJ-2019KJ04) 资助。

# Development of molecular markers of *Mycobacterium tuberculosis* rifampicin resistance gene *rpoB* by PARMS technology

Xiaohui Liu<sup>1</sup>, Xiangyang Zu<sup>1</sup>, Zhenzhen Wang<sup>2</sup>, Pengchao Zhao<sup>1</sup>, Lei Gao<sup>1</sup>, Zhanqin Zhao<sup>3</sup>, and Yun Xue<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

<sup>2</sup> Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

<sup>3</sup> College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

**Abstract:** The purpose of this study is to provide a simple and reliable genetic typing approach for molecular drug susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis*, through the developing of fluorescence molecular marker of rifampicin resistance gene *rpoB*. Eleven fluorescent molecular markers of the *rpoB* gene were established by using the sequence difference between the amino acid positions 531, 526, 516, 511 and 513 of *rpoB* gene of rifampicin-resistant strains and the alleles of rifampicin-sensitive strains, combined with the PARMS technique (Penta-primer amplification refractory mutation system). We used 104 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* to validate this marker and it was verified by sequencing as 100% correct. These samples were also tested with proportional drug sensitivity test. The coincidence rate was 94.23%. The molecular markers had high reliability for genotyping of *rpoB* gene. It can also detect low-concentration drug-resistant samples (511/533 unit point mutations) whose phenotypic susceptibility cannot be detected. The eleven sets of fluorescent molecular markers could cover 92%–96% of *rpoB* gene mutation types of rifampicin-resistant strains, and provide new idea for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, rifampicin resistance, *rpoB* gene, PARMS technology, proportional drug sensitivity test

结核病是一种古老的严重慢性消耗性传染病，由结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) 复合群引起，一直以来高居传染病死因之首。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 2019 年全球结核病报告显示，2018 年全球新发结核病患者约 1 000 万例，死亡 124 万例；全球估算利福平耐药结核病患者约为 48.4 万例，其中 78% 为耐多药结核病人；有 23 万例利福平耐药以及耐多药结核病人致死，耐药导致的结核病死亡比例远大于普通结核病的平均死亡比例<sup>[1]</sup>。全球结核病防治工作任重道远，已成为困扰公共卫生的最大问题。利福平 (Rifampicin, RFP) 耐药 MTB 受到格外重视，结核病患者对其耐药绝大多数 (约 95%–98%) 同 RFP 作用的靶分子 RNA 聚合酶  $\beta$  亚基的编码基因 *rpoB* 突变有关，且这些突变均集中在 81 bp 的利福平耐药决定区

(Rifampicin resistance determining region, RRDR)，对应编码氨基酸 507–533<sup>[2]</sup>。几乎所有 RFP 耐药菌株也对其他药物，特别是另一种一线药物异烟肼 (INH) 具有抗性，因此普遍将 RFP 耐药视为耐多药菌株的标志性特征<sup>[3]</sup>。

目前耐药性检测的“金标准”是表型药物敏感性检测，通过观察对比 MTB 在含药和不含药培养基中的生长情况来判断其耐药性，但最少需耗时 2–4 周，不能及时获知检测结果<sup>[4]</sup>。Xpert MTB/RIF 和 MTB DRplus 是 WHO 批准的两种标准分子诊断方法。Xpert 以多重荧光定量 PCR 为基础，设计引物探针选择性覆盖 RRDR，能同时检测 MTB 和 RFP 耐药基因 *rpoB* 是否存在突变，判断 MTB 耐药性<sup>[5]</sup>。样本 RRDR 序列上某个位点存在突变，就会引起探针结合失败，仪器判定结果为利福平耐药，但无法检出具体的突变位点及性质。DRplus

应用核酸线性探针杂交技术,采用 8 个野生型 (Wild type, WT) 探针和 4 种特异性突变型 (Mutant type, MUT) 探针检测 RFP 和 INH 的部分耐药基因来判断 MTB 耐药性<sup>[6]</sup>。优于 Xpert 只覆盖区域的检测,DRplus 可以根据 MUT 探针染色阳性判断 4 个 RFP 耐药最普遍的特异性点突变 (S531L、H526Y、H526D 和 D516V)。但除这 4 种突变类型外,DRplus 同 Xpert 一样,只能根据 WT 探针的缺失报告存在其他突变,无法鉴定 *rpoB* 基因的具体突变性质,对于不影响耐药表型的同义突变存在报告假阳性的情况<sup>[7-8]</sup>。基因芯片技术固定寡核苷酸探针与荧光物质标记的 DNA 杂交,将多个位点集成到一张芯片上通过信号强度判断样本信息。但过程烦琐,PCR 扩增后杂交、洗涤干燥、扫描,对实验仪器及人员要求较高<sup>[9-10]</sup>。

新型的五引物扩增受阻突变体系 PARMS (Penta-primer amplification refractory mutation system) 是一种结合突变扩增系统 ARMS (Amplification refractory mutation system) 的基因分型技术,在 ARMS-PCR 基础上增加了两条由 6-羧基荧光素 (6-carboxy-fluorescein, FAM) 和六氯-6-甲基荧光素 (Hexachlorofluorescein, HEX) 标记的引物,通过不同的荧光信号来检测基因的多态性。卿冬进等利用该技术成功实现了抗稻瘟病基因 *Pigm* 序列与其等位基因的分型,并开发了水稻粒宽调控基因 *GW8* 的荧光分子标记<sup>[11-12]</sup>。律文堂等利用该技术对水稻 *CRISPR/Cas9* 基因编辑植株进行了基因分型,鉴定结果与聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 检测和 Sanger 测序法一致<sup>[13]</sup>。PARMS 技术在不降低综合检测准确性的前提下,变特异性荧光标记探针为通用荧光标记探针,大幅降低了探针合成与标记成本,十分适合高通量基因分型检测。且目前尚未见其在多位点联合检测及耐药基因检测上的应用。

因此,本文期望将 PARMS 技术应用于 RFP 相关基因突变的检测中,为 MTB 分子耐药性检

测提供新思路。本文通过 MTB-RFP 耐药菌株 *rpoB* 突变基因与其等位基因的对比,结合 PARMS 技术开发 *rpoB* 基因的荧光分子标记,分析待检位点基因分型结果,以准确判断 RFP 耐药性。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

供试结核菌株来源于河南科技大学第一附属医院提供的 104 例抗酸染色为阳性的肺结核患者痰标本,所有菌株经改良罗氏培养基培养,用含对硝基苯甲酸和噻吩-2-羧酸胍培养基初步菌型鉴定为结核分枝杆菌。菌株培养和 DNA 提取实验在河南科技大学第一附属医院检验科的 BSL-2 生物安全实验室进行操作。标准株 H<sub>37</sub>Rv (ATCC27294) 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所结核病实验室提供。

### 1.2 利福平耐药性评价

用灭菌的接种环刮取培养基上一满环的菌落放于磨菌瓶底部,加入灭菌 5% Tween 80 水溶液,充分振荡研磨后制成菌液,与标准麦氏瓶比浊,滴加生理盐水比浊制为 1 mg/mL 的菌悬液,再稀释至 10<sup>-2</sup> mg/mL 和 10<sup>-4</sup> mg/mL。使用 22SWG 标准环分别蘸取,划线法均匀接种到含利福平 (40 μg/mL) 的罗氏固体培养基和空白对照培养基,37 °C 培养 4 周后读菌落数,计算耐药百分比,含药培养基菌落数/对照不含药培养基菌落数 ≤ 1% 即为敏感, > 1% 为耐药。

用于显色药敏最小抑菌浓度 (MIC) 检测的利福平含药培养基药物终浓度分别为 0.5、1、5、20、30、40、50、60、80 μg/mL。

### 1.3 DNA 提取

细菌 DNA 提取试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司,按照说明书进行样本 DNA 提取,得到上清液保存备用。

### 1.4 RRDR 测序

从 GenBank 获得 *rpoB* 序列 (登录号:

KY702773.1), 选用上游引物 5'-CGACCACTTC GGCAACCG-3', 下游引物 5'-TCGATCGGGCAC ATCCGG-3'进行 PCR 扩增<sup>[14]</sup>, 扩增目的 DNA 片段长度 342 bp, 覆盖 81 bp 的 RRDR 区域。反应体系共 50  $\mu$ L, 包括 2 $\times$ Taq PCR Master Mix (康为世纪) 25  $\mu$ L、引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1.5  $\mu$ L, 模板 5  $\mu$ L, 去离子水 17  $\mu$ L。扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 变性 8 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 共 35 个循环; 再 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

### 1.5 等位基因型检测方法

PARMS 技术采用 5 条引物进行 PCR 反应, 其中 2 条荧光通用引物包含在 2 $\times$  PARMS Master Mix 中。其余 3 条为标记特异引物, 需要根据实验目的定制设计合成。其基因型检测包括两个互补的 PCR 反应, 使用同样的 DNA 模板、一条相同的共有引物和相同的反应条件, 区别在于与共有引物配对的 PARMS 标记引物不同, 从而使两个反应选择性扩增相应的模板。

PCR 扩增反应体系 10  $\mu$ L, 包含 5  $\mu$ L 2 $\times$  PARMS master mix, 0.15  $\mu$ L 10 mmol/L 每个等位基因特异性引物, 0.4  $\mu$ L 10 mmol/L 通用特异性引物和 1  $\mu$ L 模板 DNA (10–100 ng)。使用荧光定量 PCR 仪设置降落式 PCR: 94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 20 s, 65  $^{\circ}$ C (-0.8  $^{\circ}$ C 每个循环) 1 min, 10 个循环; 94  $^{\circ}$ C 20 s, 57  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环。导出 FAM、HEX、ROX 荧光强度数据, 上传至 <http://www.snpway.com/snpdecoder/>, 结合标记信息, 获得分型结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 分子标记引物设计

根据结核耐药基因突变数据库 ([www.tbdbreamdb.com](http://www.tbdbreamdb.com)) 的研究表示, *rpoB* 基因 511、513、516、522、526、531、533 等 7 个氨基酸位点被认为是高度确信突变位点。同时结合国内关于 *rpoB* 突变位点的研究<sup>[14-15]</sup>, 在利福平耐药菌株中

存在最多的是 531、526、516 位点, 总占比 80% 以上, 虽然 *rpoB* 511、513、533 占比不高, 但也属于常见位点。本文中我们总共选择设计了 11 组分子标记, 位点分别为: 511 (CTG/CCG), 513 (CAA/CTA), 516 (GAC/GTC, TAC, GAG), 526 (CAC/TAC, GAC, CGC, AAC), 531 (TCG/TTG), 533 (CTG/CCG)。利用这些位点等位基因的差异性为特异性引物的 3'末端, 设计共显性的分子标记, 引物序列见表 1。

Allele 引物 5'端与 FAM 荧光匹配的接头序列为 GAAGGTGACCAAGTTCATGCT, 与 HEX 荧光匹配的接头序列为 GAAGGTGCGGAGTCAAC GGATT, 在扩增过程中分别与 PARMS master Mix 中的 FAM/HEX 荧光引物结合。如表 2 所示, 根据引物序列对比分析, 预测 PCR 扩增后, 对于分子标记 T511C、A513C、G516T, 利福平敏感菌株一定可以检测到 HEX 荧光信号, 其他耐药菌株可以检测到 FAM 荧光信号; 对于分子标记 A516T、C516G、C526G、C526T、C526A、A526G、C531T、T533C, 敏感菌株基因扩增后一定可以检测到 FAM 荧光信号, 其他耐药菌株可以检测到 HEX 荧光信号。通过检测两种荧光信号将耐药菌株与敏感菌株的基因型区分开。

### 2.2 分子标记检测等位基因在结核样本中的分布

利用设计的 11 组荧光分子标记检测 104 例结核样本 DNA 的基因型, PCR 扩增后经荧光扫描、数据分析, 结果显示 FAM 和 HEX 荧光信号的散点图见图 1。结合 PARMS 引物设计原理分析, 有 64 例样本为单位点突变 (92.75%), 其中 *rpoB* 531 (52.17%) 最多, 其次为 *rpoB* 526 (21.74%)、*rpoB* 516 (13.04%), 这 3 个位点占总突变的 86.95%。另外还存在 5 株联合突变样本 (7.25%), *rpoB* 526+533、*rpoB* 511+516、*rpoB* 513+531 各 1 例, *rpoB* 511+526 有 2 例, 见表 3。

表 1 标记引物序列

Table 1 Sequence information of marker primers in this study

<i>rpoB</i> gene	Marker name	Primer name	Sequence (5'-3')
511	T511C	Allele-T	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCTGGTCCATGAATTGGCTCA
		Allele-C	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCTGGTCCATGAATTGGCTCG
		Common-F	AGGCGATCACACCGCAGAC
513	A513C	Allele-A	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGGTTGTTCTGGTCCATGAATT
		Allele-C	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGGTTGTTCTGGTCCATGAATG
		Common-F	AGGCGATCACACCGCAGAC
516	G516T	Allele-G	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGACAGCGGGTTGTTCTGGTC
		Allele-T	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACAGCGGGTTGTTCTGGTA
		Common-F	AGGCGATCACACCGCAGAC
	A516T	Allele-A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACAGCGGGTTGTTCTGGT
		Allele-T	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGACAGCGGGTTGTTCTGGA
		Common-F	AGGCGATCACACCGCAGAC
	C516G	Allele-C	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACAGCGGGTTGTTCTGG
		Allele-G	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGACAGCGGGTTGTTCTGC
		Common-F	AGGCGATCACACCGCAGAC
526	C526G	Allele-C	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTGTCGGGGTTGACCC
		Allele-G	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCTGTCGGGGTTGACCG
		Common-R	CCCGGCACGCTCACG
	C526T	Allele-C	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCGACAGTCGGCGCTTGTG
		Allele-T	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCGACAGTCGGCGCTTGTG
		Common-F	AGGCGATCACACCGCAGAC
	C526A	Allele-C	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTGTCGGGGTTGACCC
		Allele-A	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCTGTCGGGGTTGACCA
		Common-R	CCCGGCACGCTCACG
A526G	Allele-A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCGACAGTCGGCGCTTGT	
	Allele-G	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCGACAGTCGGCGCTTGC	
	Common-F	AGGCGATCACACCGCAGAC	
531	C531T	Allele-C	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCACAAGCGCCGACTGTC
		Allele-T	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCACAAGCGCCGACTGTT
		Common-R	CCCGGCACGCTCACG
533	T533C	Allele-T	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACAGACCGCCGGGCCCA
		Allele-C	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACAGACCGCCGGGCCCG
		Common-F	AGGCGATCACACCGCAGAC

表 2 等位基因与荧光标记对应表

Table 2 Corresponding relation table of alleles and fluorescence marker

Fluorescence of alleles	Genotype of alleles										
	T511C	A513C	G516T	A516T	C516G	C526G	C526T	C526A	A526G	C531T	T533C
FAM	CC	CC	TT	AA	CC	CC	CC	CC	AA	CC	TT
HEX	TT	AA	GG	TT	GG	GG	TT	AA	GG	TT	CC

2.3 结核菌株 RFP 耐药性评价分析

RFP 耐药界限定在  $\geq 40 \mu\text{g/mL}$ ，经比例法药物敏感性实验后，结果显示 104 例临床菌株中 RFP 耐药菌株 74 例，敏感菌株 30 例，分析结果见表 4。将存在突变视为利福平耐药，两种方法相符率为 94.23% (98/104)。3 例 (2.88%) 样本没

有检测到 *rpoB* 基因突变，却表现为利福平耐药，可能是存在细胞壁通透性障碍，导致药物进入高疏水性细胞壁间隙比较慢；或者是 MTB 外排泵将药物泵出，导致菌内药物浓度降低，杀菌作用减弱从而导致耐药<sup>[16-17]</sup>。69 例突变样本中 3 例表现为利福平敏感，分别是 *rpoB* 511 单位点突变

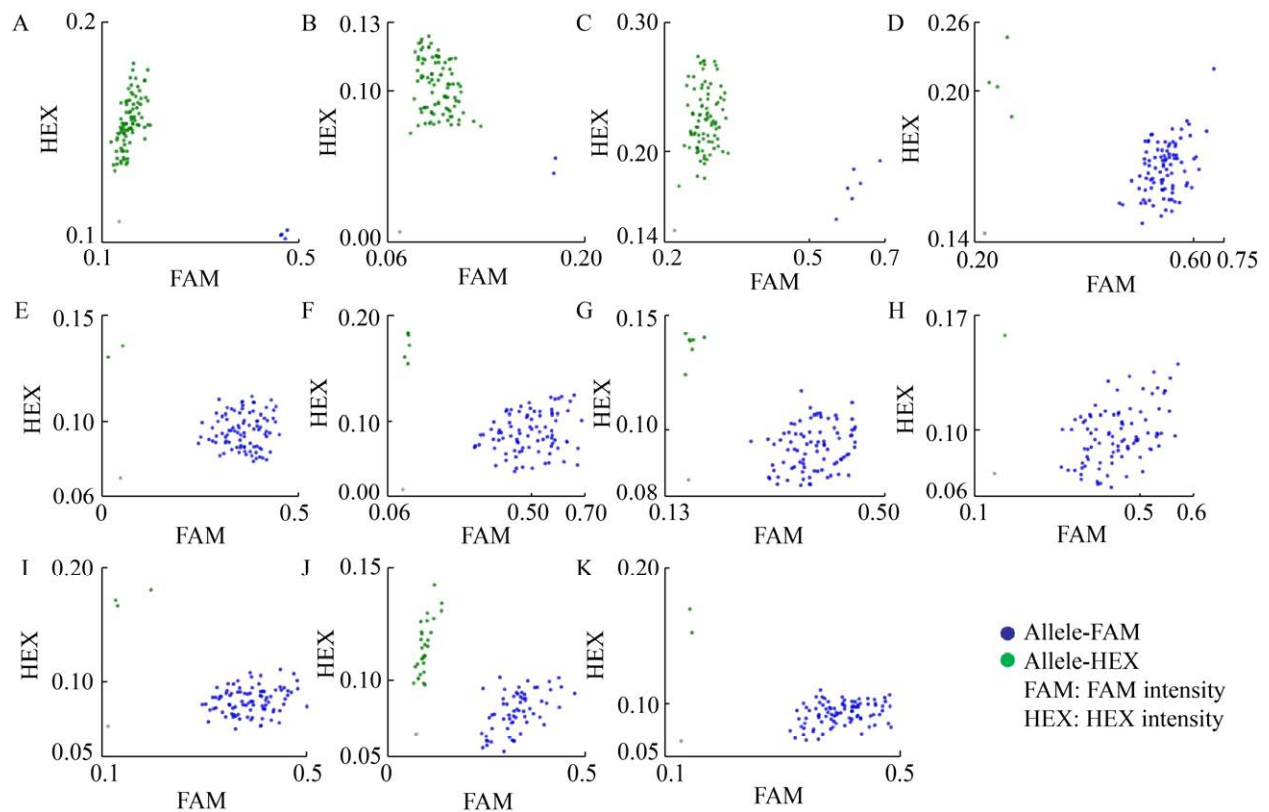


图 1 十一组分子标记的基因分型检测结果

Fig. 1 Genotyping result of 11 molecular markers. Tag (A–K) genotyping with marker primers T511C, A513C, G516T, A516T, C516G, C526A, C526G, C526T, A526G, C531T, T533C, respectively.

表 3 结核分枝杆菌临床分离株 *rpoB* 分子标记检测结果

Table 3 Test results with *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates *rpoB* molecular markers

Number	Codon	Marker name	Change of base	Change of amino acid	Amount	Total (proportion)
1	511	T511C	CTG CCG	Leu Pro	2	2 (2.82%)
2	513	A513C	CAA CCA	Gln Pro	1	1 (1.41%)
3	516	G516T	GAC TAC	Asp Tyr	6	11 (15.49%)
	516	A516T	GAC GTC	Asp Val	3	
	516	C516G	GAC GAG	Asp Glu	2	
4	526	C526G	CAC GAC	His Asp	5	15 (21.13%)
	526	C526T	CAC TAC	His Tyr	6	
	526	C526A	CAC AAC	His Asn	1	
	526	A526G	CAC CGC	His Arg	3	
5	531	C531T	TCG TTG	Ser Trp	36	36 (50.70%)
6	533	T533C	CTG CCG	Leu Pro	1	1 (1.41%)
7	526+533	C526G	CAC GAC	His Asp	1	1 (1.41%)
		T533C	CTG CCG	Leu Pro		
8	511+516	T511C	CTG CCG	Leu Pro	1	1 (1.41%)
		A516T	GAC GTC	Asp Val		
9	513+531	A513C	CAA CCA	Gln Pro	1	1 (1.41%)
		C531T	TCG TTG	Ser Trp		
10	511+526	T511C	CTG CCG	Leu Pro	2	2 (2.82%)
		C526T	CAC TAC	His Tyr		

2 例、*rpoB* 533 单位点突变 1 例。对这 3 株样本和包含 511/533 位点突变的 4 株样本进行利福平 MIC 测定, 结果显示单位点突变样本 MIC 为 10–20 μg/mL, 联合突变样本 MIC 为 50–60 μg/mL, 具体见表 5。

### 2.4 分子标记结果验证

为检验 PARMs 分子标记基因分型是否正确, 以 H<sub>37</sub>Rv 标准株 DNA 序列作为参比序列, 分析 104 例结核分枝杆菌临床分离株的测序结果。序列对比发现分子标记的分型结果与相应测序结果的符合率为 100%, 见表 6。同时也明确了 2.3 中, 11 组分子标记没有检测到突变的 3 例 RFP 耐药菌株存在其他类型的基因突变, 为 519 del AAC 1 例、522 TCG→TTG 2 例。

表 4 分子标记结果与比例法药敏结果的比较

Table 4 Comparison of molecular markers results and drug sensitivity by proportional method results

Markers detect <i>rpoB</i> gene	RFP proportional method		Total
	Sensitive	Resistance	
Mutation	3	68	71
No mutation	30	3	33
Total	30	74	104

表 5 *rpoB* 基因 511 和 533 位点突变样本 RFP MIC 结果

Table 5 RFP MIC results of *rpoB* gene 511 and 533 mutation samples

Number	<i>rpoB</i> gene mutation	RFP MIC (μg/mL)	Strain number
1 (H <sub>37</sub> Rv)	Without	1	1
2	511 CTG→CCG	10	1
3	511 CTG→CCG	20	1
4	533 CTG→CCG	20	1
5	526 CAC→GAC	60	1
	533 CTG→CCG		
6	511 CTG→CCG	50	1
	516 GAC→GTC		
7	511 CTG→CCG	60	2
	526 CAC→TAC		

表 6 分子标记和测序法检测 MTB 临床分离株 *rpoB* 突变类型的比较

Table 6 Comparison of *rpoB* mutation types of MTB clinical isolates from molecular markers and sequencing

<i>rpoB</i> gene mutation	Strain number	
	Molecular marker	Sequencing
511 CTG→CCG	4	4
513 CAA→CCA	2	2
516 GAC→TAC	6	6
516 GAC→GTC	4	4
516 GAC→GAG	2	2
526 CAC→GAC	6	6
526 CAC→TAC	7	7
526 CAC→AAC	1	1
526 CAC→CGC	3	3
531 TCG→TTG	37	37
533 CTG→CCG	2	2
519 del AAC	0	1
522 TCG→TTG	0	2

### 3 讨论

作为耐多药菌株的标志性特征, RFP 耐药检测在临床诊断工作中不可或缺, 由于表型药物敏感性试验耗时长、敏感度低, 目前多采用分子诊断方法来检测 RFP 耐药相关基因 *rpoB* 突变情况。本文使用的 PARMs 技术作为一种新型的分子标记方法, 基于荧光检测, 通过特异性引物的设计实现基因型区分, 具有操作简便、耗时短、成本低的优势, 已成功地应用于农作物的选择性育种和半滑舌鳎的性别鉴定中<sup>[11-13,18-19]</sup>。

根据 RFP 耐药菌株存在的绝大多数 *rpoB* 基因突变特征, 本文利用 PARMs 技术开发了 11 组荧光分子标记联合跟踪 *rpoB* 基因突变位点, 能精准检测出样本中存在的 1 个碱基突变, 以区分鉴定利福平耐药性, 避免了 Xpert 易被同义突变影响的问题, 同时采用的分子信标探针也比 DRplus 或其他类型的杂交探针都具有更高的特异性<sup>[2,20]</sup>。且相对于基因芯片及 Sanger 测序技术, 对实验条件、仪器要求不高, 通过荧光信号扫描和软件分

析直接获得基因型, 荧光定量 PCR 仪即可完成实验, 具有不需要进行杂交分析或 DNA 电泳的简便性<sup>[9]</sup>。

本文通过设计的 11 组分子标记对 104 例 MTB 临床分离株进行检测分型, 使用测序法进行验证, 符合率为 100%。与比例法药敏结果相比符合率为 94.23%。差异原因为: (1) 3 株样本比例法药敏结果为 RFP 耐药, 但分子标记未检测到突变, 经测序证实为 519 del AAC 一株, 522 TCG→TTG 两株, 原因是设计分子标记时忽略了这些通常出现率 < 0.09% 的突变位点<sup>[14-15,21]</sup>; (2) 3 株样本 *rpoB* 511/533 单位点突变但比例法药敏结果显示为敏感, 同时 511/533 与其他位点联合突变的 4 株样本显示为耐药。MIC 检测的结果表明: 单位点突变样本中 1 株 MIC 为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2 株 MIC 为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 4 例联合突变菌株显示 1 株 MIC 为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3 株 MIC 为 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  耐药。也就是说 *rpoB* 511/533 位点突变可能会导致低浓度耐药, 而联合突变样本中由于存在 526 或 531 等相关位点突变, 对耐药调控机制造成了影响, 导致药敏结果的不同。杨慧娟等和李国利等的研究也提示了这一问题, 因此通过分子标记方法聚合 MTB 中多个相关基因, 是精确检测 RFP 基因型耐药的有效途径<sup>[14,22]</sup>。

本文建立了利用 PARMS 技术联合检测 *rpoB* 基因 11 种碱基突变的荧光分子标记方法, 对 104 例临床结核分离株进行基因型检测, 并与菌株利福平药敏试验和 DNA 测序结果进行了对比验证, 证明了该荧光分子标记的有效性, 为临床精准快速检测结核 RFP 耐药提供了一种新方法。不足之处在于, 尽管本方法已包含 11 种利福平耐药基因特异性突变位点, 涵盖了临床约 92%–96% 的常见结核菌株耐药基因突变类型<sup>[14-15]</sup>, 但对于菌株其他罕见突变、插入、缺失等突变类型不能完全检出。由于临床结核菌株耐药机制产生原因

的复杂性, 基因突变检测结果与耐药表型结果的符合率也并非 100%, 在临床诊断条件与时间允许的情况下, 可以结合菌株药敏结果进行进一步验证。最后, 尽管 PARMS 技术对大批量精准双等位基因检测有着简便、高效、快速、便宜的优越性, 但是要实现多基因位点联合检测并将其应用于临床诊断, 还需要解决医院实验室硬件条件与操作人员技术培训等问题。我们将进一步将该方法与微流控阵列芯片法相结合, 在一张芯片预置试剂, 自动控制, 使其只需一次样本加入、一次荧光扫描即可实现多位点检测, 从而推动分子检测研究工作的发展<sup>[21]</sup>。

## 4 结论

利用 PARMS 技术结合利福平耐药相关基因 *rpoB* 的等位分析, 建立了 11 组 *rpoB* 基因的荧光分子标记。利用该标记检测了 104 份结核分枝杆菌临床分离株的基因型, 结合利福平比例法表型药敏试验与测序验证, 证明了建立的 11 组荧光分子标记能够快速、可靠地对结核菌株 *rpoB* 基因分型检测, 鉴定利福平耐药性, 同时为快速检测结核分枝杆菌利福平耐药提供新思路。

## REFERENCES

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2019[R]. Geneva: WHO, 2019.
- [2] Ombura IP, Onyango N, Odera S, et al. Prevalence of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis* among patients seen in coast provincial general hospital, Mombasa, Kenya. PLoS ONE, 2016, 11(10): e0163994.
- [3] Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. J Clin Microbiol, 2010, 48(1): 229-237.
- [4] Mabhula A, Singh V. Drug-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: where we stand. Med



- Chem Comm, 2019, 10(8): 1342-1360.
- [5] Weinrick B. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance-associated mutations by use of data from Xpert MTB/RIF ultra enables large-scale tuberculosis molecular epidemiology studies. J Clin Microbiol, 2019, 58(1): e01504-19.
- [6] Barnard M, Albert H, Coetzee G, et al. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. Am J Respirat Crit Care Med, 2008, 177(7): 787-792.
- [7] Rahman A, Sahrin M, Afrin S, et al. Comparison of Xpert MTB/RIF assay and GenoType MTBDRplus DNA probes for detection of mutations associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS ONE, 2016, 11(4): e0152694.
- [8] Williamson DA, Basu I, Bower J, et al. An evaluation of the Xpert MTB/RIF assay and detection of false-positive rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Diagnost Microbiol Infect Dis, 2012, 74(2): 207-209.
- [9] 何珍, 王璞. 基因芯片技术在快速诊断肺结核中的应用价值. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(6): 498-501, 508.  
He Z, Wang P. Clinical application value of gene chip in the diagnosis of tuberculosis. Chin J Zoon, 2019, 35(6): 498-501, 508 (in Chinese).
- [10] 林秀华, 赖国祥, 陈雨燕, 等. 基因芯片技术检测分枝杆菌和异烟肼、利福平耐药性在结核性脓胸诊断中的应用. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(8): 720-723.  
Lin XH, Lai GX, Chen YY, et al. Gene chip technology for detecting mycobacteria and *Mycobacterium tuberculosis* resistance of isoniazid and rifampin in the application of tuberculous empyema. Chin J Zoon, 2017, 33(8): 720-723 (in Chinese).
- [11] 卿冬进, 刘开强, 邓国富, 等. 基于 PARMs 技术的水稻粒形基因 GW8 分子标记的开发. 西南农业学报, 2019, 32(3): 463-469.  
Qing DJ, Liu KQ, Deng GF, et al. Developing molecular marker of rice grain shape gene GW8 based on PARMs technology. Southwest China J Agric Sci, 2019, 32(3): 463-469 (in Chinese).
- [12] 卿冬进, 刘开强, 杨燕宇, 等. 基于 PARMs 技术的抗稻瘟病基因 *Pigm* 分子标记的开发. 西南农业学报, 2018, 31(8): 1617-1621.  
Qing DJ, Liu KQ, Yang YY, et al. Development of molecular marker of rice blast resistance gene *Pigm* on basis of PARMs technology. Southwest China J Agric Sci, 2018, 31(8): 1617-1621 (in Chinese).
- [13] 律文堂, 尹静静, 阴筱, 等. PARMs 在水稻基因编辑后代基因分型中的应用研究. 山东农业科学, 2019, 51(10): 8-13.  
Lv WT, Yin JJ, Yin X, et al. Application of PARMs technology in genotyping of rice gene edited progeny. Shandong Agric Sci, 2019, 51(10): 8-13 (in Chinese).
- [14] 杨慧娟, 陈连勇, 茹浩浩, 等. 云南省结核分枝杆菌利福平耐药基因 *rpoB* 突变特征分析. 中华疾病控制杂志, 2018, 22(2): 147-152.  
Yang HJ, Chen LY, Ru HH, et al. Analysis of characteristics of *rpoB* gene mutation in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolate from Yunnan Province. Chin J Dis Control Prev, 2018, 22(2): 147-152 (in Chinese).
- [15] 陈燕. 中国结核菌耐多药和广泛耐药相关基因突变特征及 MAS-PCR 研究[D]. 衡阳:南华大学, 2014.  
Chen Y. The mutated characteristics of drug-conferring genes among MDR/XDR-TB in China and the research on MAS-PCR technique[D]. Hengyang: Nanhua University, 2014 (in Chinese).
- [16] 陈敏, 王跃. 分枝杆菌药物外排泵及其在耐药机制中作用. 中国公共卫生, 2007, 23(6): 697-699.  
Chen M, Wang Y. Mycobacterial drug efflux pump and its role in drug resistance mechanism. Chin J Public Health, 2007, 23(6): 697-699 (in Chinese).
- [17] 朱荟云, 吴芳, 吴江东, 等. 类泛素-蛋白酶体系统和药物外排泵抑制剂对结核分枝杆菌单纯利福平耐药性影响的研究. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(7): 617-623.  
Zhu HY, Wu F, Wu JD, et al. Effects of the *Mycobacterium tuberculosis* prokaryotic ubiquitin-like protein-proteasome system on the

- mono-resistant to rifampin resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. Chin J Zoon, 2017, 33(7): 617-623 (in Chinese).
- [18] Zhang B, Zhao N, Liu YY, et al. Novel molecular markers for high-throughput sex characterization of *Cynoglossus semilaevis*. Aquaculture, 2019, 513: 734331.
- [19] Lu J, Hou J, Ouyang Y, et al. A direct PCR-based SNP marker-assisted selection system (D-MAS) for different crops. Mol Breed, 2020, 40: 9.
- [20] Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nat Biotechnol, 1996, 14(3): 303-308.
- [21] 陈珊. 结核分枝杆菌耐药表型与基因型的相关性及基于微流控的 KASP 检测结核耐药突变方法的建立[D]. 湛江: 广东医科大学, 2017.
- Chen S. The relationship between phenotypic and genotypic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and development of kompetitive allele specific PCR for the detection of drug resistance mutation *Mycobacterium tuberculosis* based on microfluidic card[D]. Zhanjiang: Guangdong Medical University, 2017 (in Chinese).
- [22] 李国利, 张灵霞, 王倩, 等. 结核分枝杆菌临床分离株利福平耐药表型及 *rpoB* 基因型分析. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(21): 1649-1652.
- Li GL, Zhang LX, Wang Q, et al. Analysis of rifampin-resistant phenotype and *rpoB* genotype in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Exp Med, 2011, 10(21): 1649-1652 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)