

[28] Antoniou AC, Wang X, Fredericksen ZS, et al. A locus on 19p13 modies risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers and is associated with hormone receptor-negative breast cancer in the general population[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(10): 885-892.

[29] Antoniou AC, Kartsonaki C, Sinilnikova OM, et al. Common alleles at 6q25. 1 and 1p11. 2 are associated with breast cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(16): 3304-3321.

[30] Mukherjee N, Bhattacharya N, Sinha S, et al. Association of APC and MCC polymorphisms with increased breast cancer risk in an

Indian population[J]. *Int J Biol Markers*, 2011, 26(1): 43-49.

[31] Thomas G, Jacobs KB, Kraft P, et al. A multistage ge-nome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11. 2 and 14q24. 1 (RAD51L1)[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(5): 579-581.

[32] Ahmed S, Thomas G, Ghousaini M, et al. Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23. 2[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(5): 585-588.

(收稿日期:2012-01-24)

• 综 述 •

# 高分辨率熔解曲线技术在结核耐药检测中的应用进展

杨 辉<sup>1,2</sup>综述, 张国良<sup>2</sup>, 张明霞<sup>2</sup>审校

(1. 广州医学院 2010 级硕士研究生, 广州 510000; 2. 广东省深圳市第三人民医院肝病研究所 518000)

**关键词:** 高分辨率熔解曲线; 结核分枝杆菌; 耐药

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 07. 028

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2012)07-0830-03

结核病是严重危害人们健康的重大公共卫生问题和社会问题<sup>[1]</sup>。为此大量研究人员致力于快速诊断结核分枝杆菌耐药的研究。高分辨率熔解曲线 (high resolution melting, HRM) 技术是一种基于核酸的物理性质, 使用饱和染料反映核酸的熔解曲线变化来进行分析的技术, 其不受突变碱基位点和种类的局限, 既可以对未知突变进行筛查、扫描, 也可以对已知突变进行分析。现就使用 HRM 技术检测结核分枝杆菌耐药的研究进展作一综述。

## 1 HRM 技术介绍

HRM 分析技术是 2002 年美国犹他大学 Carl Wittwer 实验室与爱德华科技公司合作开发的一种新技术, 这种方法最初应用于单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 检测分析<sup>[2]</sup>。其实质是在常规 PCR 的基础上加入饱和染料, 无需使用特异性探针, 在 PCR 反应扩增完后进行熔解分析, 得到检测结果。

**1.1 HRM 技术检测原理** HRM 技术建立在核酸分子的物理性质不同的基础上。每个核酸分子的 GC 含量、分布、核酸长度都是不同的, 通过实时监测升温过程中的饱和染料与 PCR 产物的结合情况, 仪器通过收集这些信息进入分析软件, 形成各自的熔解曲线<sup>[3]</sup>。因此核酸在扩增后进行熔解分析时会有其独特的熔解曲线, 并且熔解曲线性质、位置都是不同的。

目前的研究发现导致结核分枝杆菌发生耐药主要是在药物相关基因发生突变所致。在利用 HRM 扩增含有碱基突变位点的耐药相关基因的过程中, 由于突变位点的碱基不匹配, 结合力相对较弱, 双链 DNA 分子在升温过程中会比野生型先熔解, 荧光染料从局部解链的 DNA 分子释放, 其熔解温度反映在熔解曲线上就会相应降低, 根据荧光强度和温度的曲线就可以判断是否存在碱基突变。而且不同的基因位点、不同突变形式都会影响熔解曲线的峰形, 因此, HRM 能有效地检测结核耐药的发生情况。

## 1.2 HRM 技术的实验基础

**1.2.1 饱和染料的出现** 由于饱和染料对 PCR 反应存在抑制作用<sup>[4]</sup>。因此在平时实验中使用的浓度很低, 远远低于将 DNA 双螺旋结构的饱和浓度, 由于使用浓度未达到饱和, 加之某些染料本身特性, 会使结果不准确。饱和染料 LC Green 等

有着更强的 DNA 结合能力和较小的抑制作用, 在 DNA 解旋过程中不会发生重排等现象, 更能体现高分辨曲线<sup>[5]</sup>。

**1.2.2 精确控温设备和高密度数据采集的仪器的开发及其专业化分析软件的出现** DNA 熔解要尽可能精确, 温度变化信息要尽可能采集, PCR 反应孔间温差要小, 并通过技术的改良来研究它的潜力<sup>[2]</sup>。

**1.3 HRM 的技术优势** HRM 技术是一个简单的闭孔系统, 被污染的可能性很小, 同时具有高通量、高灵敏度、高特异性, 快速、操作简单、重复性好、成本低廉、使用范围和检测范围广等优点<sup>[6-9]</sup>。

## 1.4 HRM 技术的主要应用

**1.4.1 SNP 分析** SNP 现象在生物体内广泛存在, 是正常生物遗传变异的表现之一, 因此对 SNP 进行分析有着极为重要的意义。Vossen 等<sup>[10]</sup>通过 HRM 分析 69 个个体的 MBL2, 发现了 3 处 SNP 位点, 目前正在研究其与炎性和感染性疾病的相关性。Jin 等<sup>[11]</sup>研究 PARP 1 基因上 2 个 SNP 位点时发现, 这 2 个 SNP 的 5 种多态性变化均可以不同程度地降低非霍奇金淋巴瘤的发病率。

**1.4.2 突变扫描** HRM 技术既能筛查未知突变, 也能检测已知突变。Hill 等<sup>[12]</sup>利用 HRM 比较 13 例慢性肉芽肿疾病患者和 96 例健康个体的 CYBB 外显子时发现, 此外显子的 19 个突变位点与 X 连锁慢性肉芽肿疾病的发生有密切关系。Ong 等<sup>[13]</sup>通过研究结核病患者患者的 rpoB、katG、ahpC、mabA-inhA 基因, 发现当这些基因发生突变时, 会出现利福平和异烟肼的耐药, 这为临床用药提供了重要依据。

**1.4.3 甲基化分析** DNA 甲基化是 DNA 碱基序列的一种正常共价修饰。Snell 等<sup>[14]</sup>应用 HRM 验证了 BRCA1 和 BRCA2 基因启动子的甲基化水平与家族性乳腺癌的发生密切相关。HRM 技术的其他用途主要有等位基因频率分析、物种鉴定、亲子鉴定等, 由于其独有的技术优势, 使用范围越来越广。

## 2 HRM 技术应用于结核分枝杆菌耐药检测的现状

随着分子生物学理论和技术的发展, 结核分枝杆菌的耐药机制和分子基础大部分已被发现, 因此, 科学家们开辟了一条新的检测结核分枝杆菌耐药的通道, 利用结核分枝杆菌的耐药

相关基因来进行 HRM 分析,根据检测位点的突变情况来判断其耐药性。

**2.1 利福平** 利福平主要作用对象是结核分枝杆菌 DNA 依赖的 RNA 聚合酶的  $\beta$  亚基,通过抑制 mRNA 的转录,发挥抗菌作用,与之相关的耐药基因主要是其编码基因 *rpoB*<sup>[15]</sup>。95% 左右的利福平耐药菌株的基因突变都集中在该基因的 507~533 位氨基酸,所以该 81 bp 碱基所构成的突变区称为利福平耐药决定区<sup>[16]</sup>。导致利福平耐药的最主要位点为 531、526 位点<sup>[13-15,17-18]</sup>。

由于利福平耐药相关基因研究已较明确,HRM 技术对结核耐药的检测便主要针对 *rpoB*。Ong 等<sup>[13]</sup>对 *rpoB* 基因的利福平耐药决定区进行检测,发现 28 株利福平耐药菌株中存在 12 种突变形式,涉及 7 个氨基酸位点,主要为第 531、526 位点,其敏感性为 89.3%,特异性为 100%。随后 Ramirez 等<sup>[17]</sup>对 154 株利福平耐药菌株进行分析,Ser531Leu 和 His526Tyr 是主要形式,其敏感性为 91%,特异性为 98%。Choi 等<sup>[18]</sup>进行类似研究,对 73 株利福平耐药菌株进行分析,主要是第 531、526、516 位点突变,敏感性为 98.6%,特异性为 100%。这些检测结果均提示 HRM 技术用于检测的敏感性和特异性均较高,为以后进行其他相关研究提供参考。

**2.2 异烟肼** 异烟肼耐药机制非常复杂,与之耐药相关的基因较多,主要包括 *katG*、*inhA*、*kasA*、*ahpC*、*ndh* 等,其中最主要的耐药基因为 *katG*、*inhA* 基因<sup>[19]</sup>。*katG* 基因是过氧化氢酶-过氧化物酶的编码基因,*katG* 基因常见的点突变位点是第 315 位氨基酸和第 463 位氨基酸。*katG* 基因第 315 位氨基酸突变通常会造过氧化氢-氧化物酶活性的降低,造成中等水平到高水平的耐药<sup>[20]</sup>。

*inhA* 基因是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 依赖的 enoyl-ACP 还原酶的编码基因。*inhA* 基因突变约占异烟肼临床耐药株的 8%~20%,其最常见的突变位点为其启动子区域的一 15 位点 C→T 突变<sup>[21]</sup>。*kasA* 基因编码  $\beta$  酮酰基载体蛋白合成酶,参与分枝菌酸生物合成,是异烟肼耐药的另一个相关基因。*ahpC* 基因是烯酰基还原酶的编码基因,它能控制解毒酶基因的表达,如 *katG* 基因的表达。*ndh* 基因能编码 NADH 脱氢酶,*ndh* 基因的突变使 NADH 脱氢酶活性受到抑制,使 NADH/NAD 比率升高,抑制异烟肼的过氧化,也阻止异烟肼乙酸 NADH 与 *InhA* 酶的结合,从而使细菌产生耐药性。

异烟肼耐药相关基因较多,耐药机制比较复杂,目前研究人员使用 HRM 技术检测异烟肼耐药主要针对其主要基因。Ong 等<sup>[13]</sup>对 53 株耐异烟肼菌株进行 *katG*、*mabA*-*inhA* 启动子区域和 *ahpC* 基因分析,发现 *katG* 有 6 种突变,*mabA*-*inhA* 启动子区域有 5 种,*ahpC* 有 6 种,敏感性为 98.1%,特异性为 83.3%。Choi 等<sup>[18]</sup>对 *katG*、*inhA* 基因进行研究,发现 *katG* 突变形式主要为 *katG*315 (AGC→ACC) 和 *inhA*-15 (C→T),由这 2 个基因导致的异烟肼耐药占总异烟肼耐药的 90%,其敏感性为 84.1%,特异性为 100%。Ramirez 等<sup>[17]</sup>对 *katG*、*inhA* 基因进行结核耐药研究,表明主要突变位点是 *kat*315,存在 3 种突变形式,*inhA* 启动子区域的一 15 和 -8 位点发生突变,敏感性为 87%,特异性为 100%。Chen 等<sup>[3]</sup>对 *katG*、*inhA* 基因研究显示,*katG*315 存在 6 种突变形式,*inhA* 存在 3 种,其敏感性为 95.7%,特异性为 97.8%。随着异烟肼耐药相关基因和耐药机制的深入研究,其敏感性必定会得到较大提高。

**2.3 乙胺丁醇** 乙胺丁醇耐药基因主要为 *embB*。*embB* 基因

是阿拉伯糖基转移酶的编码基因,*embB* 基因突变导致糖基转移酶结构改变,影响了乙胺丁醇和糖基转移酶的结合而产生耐药,其中第 306 位密码子的错义突变最为常见<sup>[22]</sup>。目前尚未发现有研究人员使用 HRM 技术对乙胺丁醇耐药进行研究,可以作为下一步研究目标。

**2.4 吡嗪酰胺** 吡嗪酰胺是一种烟酰胺类似物,在细胞内酸性环境中经吡嗪酰胺酶作用转变成吡嗪酸而起到杀菌作用。编码吡嗪酰胺酶的 *pncA* 基因突变致使酶活性丢失是其主要的耐药机制。目前文献报道的突变位点很多,未发现主要突变位点。由于吡嗪酰胺药物活性受环境影响较大,常规以培养结核分枝杆菌来进行药敏方法很难用于其耐药检测。同时,由于 *pncA* 突变位点较多,目前未曾报道使用 HRM 技术来分析其耐药,这将是一个新的研究方向。

**2.5 链霉素** 链霉素主要作用于结核分枝杆菌的核糖体,抑制其蛋白质的合成,其耐药相关基因主要为 *rpsL*、*rrs* 基因。*rpsL* 基因突变是链霉素耐药的主要机制,主要突变位点为第 43、88 位点<sup>[23]</sup>。

Wang 等<sup>[23]</sup>使用 HRM 技术对 *rpsL* 基因进行分析,通过对 104 个耐链霉素菌株分析,发现 56.7% 的存在第 43 (AAG→AGG) 位点和 22.1% 的存在第 88 (AAG→AGG) 位点突变,其敏感性为 100%,特异性为 100%。Blaschitz<sup>[24]</sup>等针对 *rrs* 基因的 3 个 SNP 位点进行检测,第 1 401、1 402 位 SNP 与结核耐药密切相关。

**2.6 氟喹诺酮类药物** 氟喹诺酮类药物主要作用于结核分枝杆菌的 DNA 旋转酶,主要是 *gyrA* 基因。突变大多发生在 *gyrA* 基因保守区第 67~106 位的密码子区,常见第 90、94 位点<sup>[24]</sup>。Chen 等<sup>[3]</sup>使用 HRM 技术对氟喹诺酮类药物耐药的菌株进行分析,主要针对其 *gyrA* 基因。对 41 株耐喹诺酮类药物的菌株检测发现,存在 6 种不同突变形式,主要为第 90 (GCG→GTG)、94 (GAC→GGC) 位点,其敏感性为 100%,特异性为 98.6%。

### 3 展望

2009 年举行的“耐多药/广泛耐药结核病高负担国家部长级会议”一致认为目前结核病的控制情况不容乐观,结核病防治相关保障措施仍然不够,强调耐药结核病的控制亟待开展,诊断耐多药/广泛耐药结核病是很大的挑战<sup>[25]</sup>。

目前检测结核分枝杆菌耐药最广泛同时也是最有效的方法仍然是细菌培养加药敏试验,但是花费时间太长。研究人员通过分子生物学方法来缩短检测时间,使用的方法主要包括直接测序法、基因芯片法和分子杂交法等。直接测序法操作复杂,容易造成污染,成本过高限制了其应用于临床;基因芯片法具有高特异性、高灵敏度等优点,虽然已有商业化的试剂盒,但存在需要专门的仪器设备、检测成本高等问题<sup>[26]</sup>。反向斑点分子杂交法总体敏感性和灵敏性高,但假阳性率和假阴性率较高<sup>[27]</sup>。

HRM 作为近年来兴起的一项新的分子生物学技术,也存在其局限性。第一,进一步提高 HRM 耐药检测的敏感性和特异性是今后研究的主要任务之一,这需要继续探索结核耐药相关基因和相关位点,进而扩大其检测范围。第二,目前 HRM 技术检测主要针对的都是前线药物,尤其是一线药物耐药相关基因的高频位点,今后可能要扩大位点范围和检测药物种类。第三,目前绝大部分菌株来源都是痰液,怎么提高痰液中结核分枝杆菌的核酸提取质量也是 HRM 检测技术的关键问题。

综上所述,目前 HRM 技术用于性结核分枝杆菌耐药检测

虽存在一些不足,但还是有其特有的优势。高灵敏度、高特异性、高通量、低成本、污染少,这些都将是以后应用于临床进行早期、有效的检测,为临床医师提供用药思路,早日治疗结核病提供帮助。

## 参考文献

- [1] WHO. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report[R]. Geneva, Switzerland: WHO, 2009.
- [2] Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes[J]. Clin Chem, 2003, 49(3): 396-406.
- [3] Chen XY, Kong F, Wang Q, et al. Rapid detection of Isoniazid, rifampin and of loxacin resistance in mycobacterium tuberculosis clinical Isolates using high resolution melting analysis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8): 3025-3035.
- [4] Dufresne SD, Belloni DR, Wells WA, et al. BRCA 1 and BRCA2 mutation screening using Smart Cycler II high resolution melt curve analysis[J]. Arch Pathol Lab Med, 2006, 130(2): 185-187.
- [5] Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high throughput assessment of methylation[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(8): 41-44.
- [6] Hoek KGP, Pittius NC, Smook H, et al. Fluorometric assay for testing rifampin susceptibility of Mycobacterium tuberculosis complex[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(4): 1369-1373.
- [7] Erekat S, Bar-Gal GK, Nasereddin A, et al. Rapid differentiation of mycobacterium tuberculosis and bovis by high-resolution melt curve analysis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11): 4269-4272.
- [8] Alonso M, Navarro Y, Barletta F, et al. A novel method for the rapid and prospective identification of Beijing Mycobacterium tuberculosis strains by high-resolution melting analysis[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(3): 349-357.
- [9] Pietzka AT, Indra A, Stoger A, et al. Rapid identification of multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates by rpoB gene scanning using high-resolution melting curve PCR analysis[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(6): 1121-1127.
- [10] Vossen RH, Duijn M, Daha MR, et al. High throughput genotyping of mannose binding lectin variants using high resolution DNA melting analysis[J]. Hum Mutat, 2010, 31(4): 1286-1293.
- [11] Jin XM, Kim HN, Lee IK, et al. PARP1 Val762Ala polymorphism is associated with reduced risk of non-Hodgkin lymphoma in Korean males[J]. BMC Med Genet, 2010, 11(1): 38-40.
- [12] Hill HR, Auqustine NH, Pryor RJ, et al. Rapid genetic analysis of X-linked chronic granulomatous disease by high resolution melting[J]. J Mol Diagn, 2010, 12(3): 368-376.
- [13] Ong DCT, Yam WC, Siu GK, et al. Rapid detection of rifampicin and isoniazid-resistant mycobacterium tuberculosis by high resolution melting analysis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1047-1054.
- [14] Snell C, Krypuy M, Wong E, et al. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(1): 12-20.
- [15] Neuta IH, Varela A, Martin A, et al. Rifampin-isoniazid oligonucleotide typing: an alternative format for rapid detection of multi-drug-resistant mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(12): 4386-4391.
- [16] Riska PF, Jacobs WR, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2000, 4(2): 4-10.
- [17] Ramirez MV, Cowart KC, Campbel PJ, et al. Rapid detection of multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11): 4003-4009.
- [18] Choi GE, Lee SM, Yi JY, et al. High-resolution melting curve analysis for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11): 3893-3898.
- [19] Siu GKH, Tam YH, Ho PL, et al. Direct detection of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens by multiplex allele-specific polymerase chain reaction[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 69(1): 51-58.
- [20] Marttila HJ, Soini H, Eerola E, et al. A Ser315Thr substitution in katG is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates originating from the St. Petersburg area in Russia[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(9): 2443-2445.
- [21] Imperiale BR, Cataldi AA, Morcillo NS. Rapid detection of multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis by multiplex allele-specific polymerase chain reaction[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2011, 15(4): 496-501.
- [22] Mokrousov I, Otten T, Vysheuevskiy B, et al. Detection of embB306 mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from North-western Russia: implications for genotypic resistance testing[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3810-3813.
- [23] Wang FF, Shen HB, Guan M, et al. High-resolution melting facilitates mutation screening of rpsL gene associated with streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Microbiol Res, 2011, 166(2): 121-128.
- [24] Blaschitz M, Hasanacevic D, Hufnagl P, et al. Real-time PCR for single-nucleotide polymorphism detection in the 16S rRNA gene as an indicator for extensive drug resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(6): 1243-1246.
- [25] 陈明亭. 全球结核病控制和患者治疗耐多药/广泛耐药结核病高负担国家部长级会议在京召开[J]. 中国防痨杂志, 2009, 31(5): 320.
- [26] 刘申, 刘智勇, 黄庆, 等. 基因芯片检测系统在分枝杆菌属鉴定及耐药性分析的临床应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(10): 1959-1962.
- [27] 罗丹, 向延根, 潘建华, 等. 反向斑点杂交技术检测结核分枝杆菌 3 种耐药相关基因[J]. 吉林大学学报(医学版), 2011, 37(4): 759-762.

(收稿日期: 2012-01-19)