

# 多耐药临床分离株结核分支杆菌耐药基因 *rpsL* 的克隆表达及功能的初步研究

张万江<sup>1</sup>, 鲍朗<sup>2</sup>, 邓喜玲<sup>3</sup>, 吴芳<sup>1</sup>, 曹旭东<sup>1</sup>, 王晓樱<sup>2</sup>

(1. 石河子大学 新疆地方与民族高发病 省部共建教育部重点实验室, 中国新疆 石河子 832002; 2. 四川大学 华西医学中心 基础法医学院 感染免疫研究室, 中国四川 成都 610041; 3. 石河子大学 药学院, 中国新疆 石河子 832002)

**摘要** 制备多耐药临床分离株结核分支杆菌基因组 DNA, PCR 扩增其耐药基因 *rpsL* 基因和 *rrS* 基因, 同时进行测序分析, 结果显示该株多耐药临床分离株结核分支杆菌的 *rpsL* 基因的 93、94 bp 处的碱基发生了突变, 碱基 C、C 突变为 T、T, 使得相对应的编码氨基酸由脯氨酸(Pro)突变为亮氨酸(Leu); 而 *rrS* 基因未发生核苷酸的插入、缺失或取代; 进一步构建该株多耐药临床分离株结核分支杆菌耐药基因 *rpsL* 高效原核表达重组载体 *pGEX-λ T/rpsL*, 所构建的重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 在大肠杆菌中高效表达了 38 kD 的融合蛋白。结果提示, 该株多耐药临床分离株结核分支杆菌对链霉素耐药仅仅是由于 *rpsL* 基因的个别碱基突变, 是单基因型的, 在国内外属首次研究发现。

**关键词** 结核分支杆菌 耐药基因 *rpsL* 克隆 功能

中图分类号: Q78, R378

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2005)01-0043-06

## Cloning *rpsL* Gene of the Multi-drug Resistant Strains of Clinical Isolated *Mycobacterium Tuberculosis* Strain and Studies of its Function

ZHANG Wan-jiang<sup>1</sup>, BAO Lang<sup>2</sup>, DENG Xi-ling<sup>3</sup>, WU Fang<sup>1</sup>,  
CAO Xu-dong<sup>1</sup>, WANG Xiao-ying<sup>2</sup>

(1. Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang, China; 2. Research Unit of Infection and Immunity, Huaxi Medical Center, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China; 3. Pharmaceutical School, Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang, China)

**Abstract** : The genome DNA of the multi-drug resistant strains of clinical isolated *Mycobacterium tuberculosis* was prepared and the drug-resistance *rpsL* gene and *rrS* gene of the *Mycobacterium tuberculosis* were enlarged by PCR, and were sequenced. The result showed that the sequence of *rpsL* gene at 93 and 94 bp, with C C changing to T T, turned the corresponding proline to leucine. Constructing recombinant plasmid *pGEX-λ T/rpsL* and fusion expression 38 kD protein from *E. coli JM 109*, it was demonstrated that the point mutation of *rpsL* gene may cause *Mycobacterium* resistant to SME, such single gene mutation induced drug resistance

收稿日期: 2004-07-12; 修回日期: 2004-09-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070670)

作者简介: 张万江(1967-), 男, 新疆石河子人, 石河子大学副教授, 医学博士, 硕士生导师, 从事感染性疾病的病理生理学研究, E-mail: zwj1117@sina.com; 鲍朗(1954-), 四川成都人, 四川大学教授, 博士生导师, 从事感染免疫的分子生物学研究, E-mail: baolang@wcums.edu.cn.

has not been studied yet.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; drug-resistance *rpsL* gene; clone; function

(*Life Science Research*, 2005, 9(1): 043 ~ 048)

结核病是严重危害人类健康的传染病, 是我国重点控制的重大疾病之一, 也是全球关注的公共卫生问题和社会问题. 近年来, 结核病在全球的回升及多耐药结核分支杆菌的出现, 再次引起了人们的警觉, 使人们重新将注意力集中到结核病发病机制和耐药结核分支杆菌的分子基础研究, 特别是对耐药结核分支杆菌耐药分子机制的研究取得了令人鼓舞的进展<sup>[1]</sup>. 结核分支杆菌耐药性的出现是基因突变的一种表达方式, 结核分支杆菌内耐药的位点在染色体上, 不同药物的耐药突变株存在的突变频率各不相同<sup>[2]</sup>. 耐药性有多种不同的程度, 根据决定耐药基因数量的不同, 可分为单基因型和多基因型两类. 前者不同程度的耐药性是一个基因不同突变的结果, 一次突变就可使结核分支杆菌产生高水平的耐药; 多基因型不同程度的耐药性则是不同基因突变累积的结果, 系由多基因突变所致<sup>[3]</sup>. 结核分支杆菌耐药基因突变的类型主要是点突变, 其实质是一个基因内部的一个或几个核苷酸的插入、缺失或取代, 致使核苷酸错误的密码编出错误的氨基酸顺序<sup>[3, 4]</sup>. 结核分支杆菌耐药基因突变形式以及碱基突变的位点是千变万化的, 并且不同的地区, 不同的菌株、碱基突变的位置和形式也是有差异的<sup>[5, 6]</sup>.

我们以前进行结核分支杆菌耐药性检测的研究结果提示, 有一株临床分离的多耐药株结核分支杆菌对链霉素的耐药分子机制可能较为特殊, 因此我们对该株结核分支杆菌对链霉素的耐药分子机制进行了进一步的研究. 利用 PCR 技术扩增该株结核分支杆菌的 *rpsL* 基因和 *rrS* 基因, 同时对 *rpsL* 基因和 *rrS* 基因进行了序列的测定和基因功能方面的研究.

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 临床分离株由成都市结核病防治研究院提供; 质粒 *pGEX-λ T* 和宿主菌 *JM109* 均由本室保存.

#### 1.1.2 主要试剂

PCR 纯化试剂盒 (Roche), PCR 相关试剂、

DNA Ligation Kit Ver. 2、5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶 -β-D- 半乳糖苷 (X-gal)、异丙基 -β-D- 硫代半乳糖苷 (PTC)、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、*EcoR* I、*Bam*H I、*Hind* III (TakaRa Biotechnology), 丙烯酰胺、N-N'- 亚甲基双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠 (BRL)、考马斯亮蓝 R250、四甲基乙二胺 (Sigma), 蛋白质相对分子质量标准 (GIBCOL BRL).

### 1.2 主要仪器

凝胶图像分析系统 (Uvi), 超纯水处理系统 (Milipore), Biometra 550 型 PCR 扩增仪, 低温冷冻离心机 (Eppendoff), Lambda Bio 40 UV/VIS Spetrometer 紫外分光光度计 (PE).

### 1.3 方法

#### 1.3.1 结核分支杆菌基因组 DNA 的制备

根据文献[7]的方法改进, 制备结核分支杆菌基因组 DNA. 取少量制备的 DNA 通过 DNA 凝胶电泳和紫外分光光度计检测分析 DNA 浓度及纯度, 其余 -20 °C 保存备用.

#### 1.3.2 结核分支杆菌 *rpsL* 基因和 *rrS* 基因的 PCR 扩增及序列测定

##### 1.3.2.1 PCR 引物的设计和合成

引物序列根据结核分支杆菌 *H37Rv* 的 *rpsL* 基因和 *rrS* 基因序列自主设计,

P1: 5'-GCGGATCCATGTTTTGTTGGAG-3',

P2: 5'-GCGAATTCTTAAGAAAGGAGGTG-3',

P3: 5'-GCGGATCCATGCCAACCATCCAG-3',

P4: 5'-GCGAATTCTTAGCCCTTCTCTTT-3',

P1 和 P3 引物各包含基因的起始密码并引入 *Bam*H I 酶切位点, P2 和 P4 引物各包含基因的终止密码并引入 *Eco*R I 酶切位点, 引物由上海基康生物技术有限公司合成.

##### 1.3.2.2 临床分离株结核分支杆菌 *rpsL* 基因和 *rrS* 基因的 PCR 扩增

以临床分离株结核分支杆菌基因组 DNA 为模板, 用引物 P1、P2 PCR 扩增临床分离株结核分支杆菌 *rrS* 基因; 以临床分离株结核分支杆菌基因组 DNA 为模板, 用引物 P3、P4 PCR 扩增临床分离株结核分支杆菌 *rpsL* 基因, PCR 扩增产物以 DNA 凝胶电泳鉴定; 用 PCR 纯化试剂盒纯化 (Roach) 上述 PCR 扩增的产物 (按试剂盒操作说

明进行),取纯化产物样品 5  $\mu$ l DNA 凝胶电泳鉴定纯化效果。取一定量纯化的临床分离株结核分支杆菌 *rpsL* 基因和 *rrS* 基因的 PCR 扩增产物用于测序。

### 1.3.3 结核分支杆菌耐药基因 *rpsL* 高效原核表达重组载体的构建

#### 1.3.3.1 质粒 *pGEX- $\lambda$ T* DNA 的小量提取

按碱裂解法提取质粒 DNA,以 DNA 凝胶电泳鉴定效果,初步判断分子质量的大小,并大致估计其浓度,其余  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 1.3.3.2 临床分离株结核分支杆菌 *rpsL* 基因的 PCR 扩增产物与质粒 *pGEX- $\lambda$ T* 的酶切、纯化、连接及转化

按常规方法进行酶切、纯化、连接及转化,同时对结果进行鉴定。

#### 1.3.3.3 重组质粒 *pGEX- $\lambda$ T/rpsL* 的筛选和鉴定

从转化后的  $37^{\circ}\text{C}$  过夜培养的平板上挑取单个菌落接种于 3 ml 含氨苄青霉素 100 mg/L 的 LB 液体培养基中, $37^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜。离心菌液,收集细菌,按碱裂解法提取质粒 DNA,以 DNA 凝胶电泳鉴定效果,初步判断分子质量的大小,并大致估计其浓度,其余  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

以重组质粒 *pGEX- $\lambda$ T/rpsL* DNA 为模板,同时设空质粒 *pGEX- $\lambda$ T* 载体 DNA 对照;用引物 P3、P4 PCR 扩增,以 DNA 凝胶电泳鉴定有无临床分离株结核杆菌 *rpsL* 基因的 PCR 扩增产物。

取 10  $\mu$ l 重组质粒 *pGEX- $\lambda$ T/rpsL* DNA,分别加入 *Bam*H I 内切酶和 *Eco*R I 内切酶进行双酶切鉴定,取样品 5  $\mu$ l DNA 凝胶电泳鉴定酶切效果,观察有无临床分离株结核杆菌 *rpsL* 基因被双内切酶切下,并估计其大小。

### 1.3.4 重组质粒 *pGEX- $\lambda$ T/rpsL* 在大肠杆菌中的表达

#### 1.3.4.1 含重组质粒 *pGEX- $\lambda$ T/rpsL* 大肠杆菌的诱导生长

根据《分子克隆实验指南》介绍的方法制备

#### 1.3.4.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 样品制备

根据《分子克隆实验指南》介绍的煮沸法小量制备。

#### 1.3.4.3 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

根据《分子克隆实验指南》介绍的方法进行。

### 1.3.5 含重组质粒 *pGEX- $\lambda$ T/rpsL* 的大肠杆菌对链霉素耐药性的研究

将含有 *pGEX- $\lambda$ T* 质粒的大肠杆菌 *JM109* 和含重组质粒 *pGEX- $\lambda$ T/rpsL* 大肠杆菌 *JM109* 分别铺皿于 LB 固体培养基上 (含氨苄青霉素 100 mg/L,链霉素 10 mg/L)  $37^{\circ}\text{C}$  过夜培养。观察有无细菌生长及细菌生长的情况。

## 2 结果

### 2.1 结核分支杆菌基因组 DNA 的制备

提取的临床分离株结核分支杆菌基因组 DNA 经 DNA 凝胶电泳检测表明无降解,无蛋白质和 RNA 污染 (图 1)

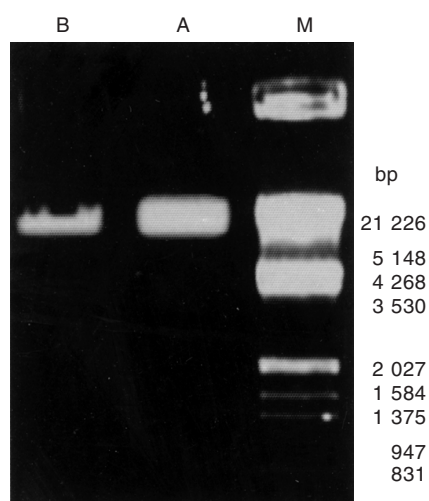


图 1 结核分支杆菌基因组 DNA 凝胶电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis of genomic DNA of *Mycobacterium tuberculosis*

M: DNA mark ( $\lambda$ DNA/*Hind* III + *Eco*R I); A: Genomic DNA of *Mycobacterium tuberculosis*; B: Genomic DNA of *Mycobacterium tuberculosis*.

### 2.2 结核分支杆菌 *rpsL* 基因和 *rrS* 基因的 PCR 扩增及序列测定

#### 2.2.1 临床分离株结核分支杆菌 *rpsL* 基因和 *rrS* 基因的 PCR 扩增

以临床分离株结核分支杆菌基因组 DNA 为模板,用引物 P1、P2 在适宜的条件下 PCR 扩增出大小约 1.5 kb 的特异性片段 (图 2),与已知的结核分支杆菌 *H<sub>37</sub>Rv* 株 *rrS* 基因的大小接近。以临床分离株结核分支杆菌基因组 DNA 为模板,用引物 P3、P4 在适宜的条件下 PCR 扩增出大小约 370 bp 的特异性片段 (图 2),与已知的结核杆菌 *H<sub>37</sub>Rv* 株 *rpsL* 基因的大小接近。

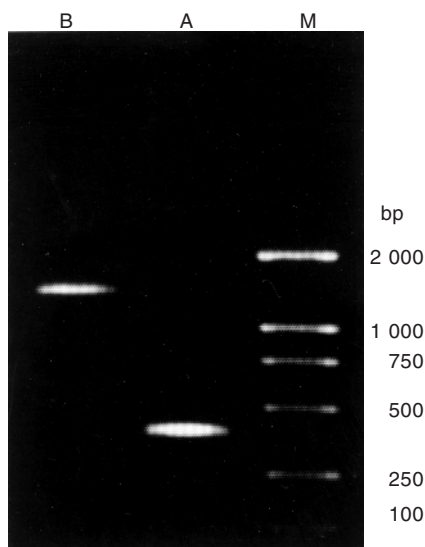


图 2 临床分离株多耐药结核分支杆菌 *rpsL*、*rrS* 基因的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of *rpsL* gene and *rrS* gene of the drug-resistance of clinical isolated *Mycobacterium Tuberculosis* strains

M: DNA marker (DL2000); A: *rpsL* gene of PCR products; B: *rrS* gene of PCR products.

### 2.2.2 临床分离株结核分支杆菌 *rpsL* 基因和 *rrS* 基因的序列测定

取一定量的纯化的临床分离株结核分支杆菌 *rpsL* 基因和 *rrS* 基因的 PCR 扩增产物用于序列测定, 测序结果表明: 临床分离株结核分支杆菌 *rpsL* 基因碱基序列与已知结核分支杆菌 *H<sub>37</sub>Rv* 株 *rpsL* 基因序列相比较发现, 临床分离株结核分支

杆菌 *rpsL* 基因碱基序列在 93、94 bp 处发生了碱基的突变, 碱基 C、C 突变为 T、T, 使得相对应的编码氨基酸由脯氨酸 (Pro) 突变为亮氨酸 (Leu); 临床分离株结核分支杆菌 *rrS* 基因序列与结核分支杆菌 *H<sub>37</sub>Rv* 株 *rrS* 基因序列完全相同, 没有碱基的插入、缺失或取代。

表 1 临床分离株结核分支杆菌 *rpsL* 基因碱基序列 (93、94 bp 处) 与结核分支杆菌 *H<sub>37</sub>Rv* 株 *rpsL* 基因碱基序列 (93、94 bp 处) 比较分析

Table 1 The sequence of *rpsL* gene at 93 and 94 bp of the multi-drug resistant strain of clinical isolated *Mycobacterium tuberculosis* comparison of the *Mycobacterium tuberculosis H<sub>37</sub>Rv* strain

	结核分支杆菌 <i>H<sub>37</sub>Rv</i> 株 <i>H<sub>37</sub>Rv</i> strain	临床分离株结核分支杆菌 Clinical isolated strain
<i>rpsL</i> 基因碱基序列 (93、94 bp 处)		
The sequence of <i>rpsL</i> gene at 93 and 94 bp	C C	T T
相对应的编码氨基酸		
Corresponding coding amino acid	脯氨酸 (Pro)	亮氨酸 (Leu)

### 2.3 结核分支杆菌耐药基因 *rpsL* 高效原核表达重组载体的构建

提取重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* DNA, 电泳鉴定, 结果显示重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* DNA 的分子质量较质粒 *pGEX-λ T* DNA 的分子质量稍大, 初步判断重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 构建成功 (图

3), 进一步以重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* DNA 为模板, PCR 扩增, 电泳鉴定结果显示有大小约 370 bp 的阳性扩增条带, 大小与临床分离株结核分支杆菌 *rpsL* 基因的大小接近 (图 4), 说明重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 构建成功。同时提取重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* DNA, 经 *EcoR* I、*Bam* H I 内切酶

双酶切鉴定,结果显示酶切下一条大小约 370 bp 的条带,大小与临床分离株结核分支杆菌 *rpsL* 基因的大小接近(图 4),进一步证实重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 构建成功。

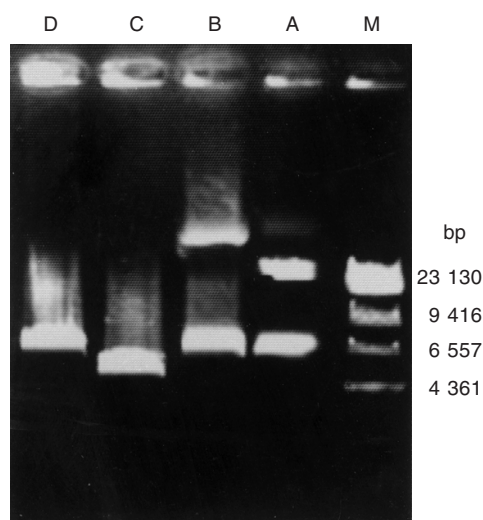


图 3 重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 的单酶切鉴定  
Fig. 3 Enzyme identification of recombinant plasmid *pGEX-λ T/rpsL*

M: DNA mark( $\lambda$ DNA/*Hind* III); A: plasmid *pGEX-λ T* DNA; B: recombinant plasmid *pGEX-λ T/rpsL* DNA; C: digestion of plasmid *pGEX-λ T* DNA with *EcoR* I; D: digestion of plasmid *pGEX-λ T/rpsL* DNA with *EcoR* I.

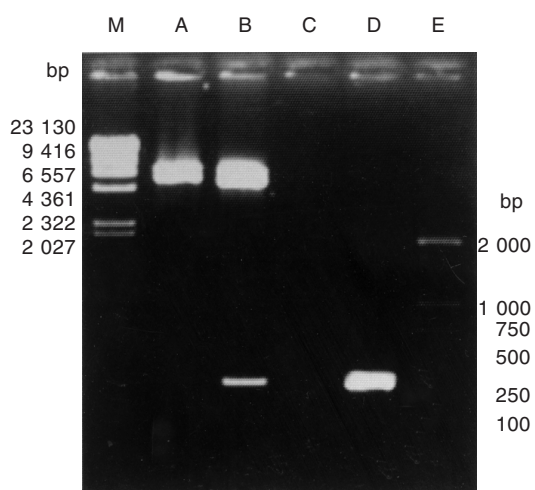


图 4 重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 的双酶切及 PCR 鉴定  
Fig. 4 Enzyme and PCR identification of recombinant plasmid *pGEX-λ T/rpsL*

M: DNA mark( $\lambda$ DNA/*Hind* III); A: digestion of plasmid *pGEX-λ T* DNA with *EcoR* I and *BamH* I; B: digestion of plasmid *pGEX-λ T/rpsL* DNA with *EcoR* I and *BamH* I; C: PCR amplification of *rpsL* gene in plasmid *pGEX-λ T* DNA; D: PCR amplification of *rpsL* gene in plasmid *pGEX-λ T/rpsL* DNA; E: DNA mark(DL2000).

## 2.4 重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 在大肠杆菌中的表达

在变性聚丙烯酰胺凝胶上,经 IPTG 诱导的质粒 *pGEX-λ T* 表达产物在 26 kD 处出现 GST 蛋白带;经 IPTG 诱导的重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 表达产物在 38 kD 处出现较浓的蛋白带。由于 *rpsL* 基因编码大小约 12 kD 的蛋白质,加上 26 kD GST 蛋白,故 38 kD 蛋白为包含 *rpsL* 基因编码蛋白质的融合蛋白(图 5)。

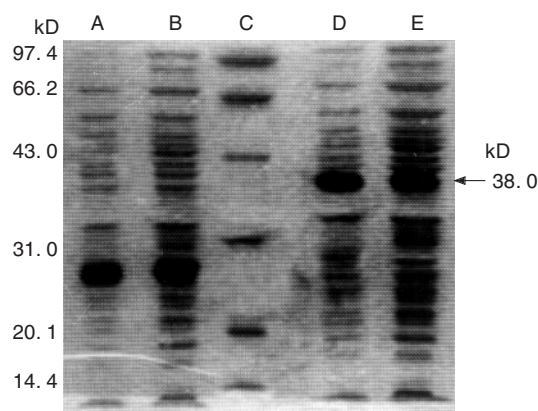


图 5 重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of fusion expression protein from *E. coli JM109* bearing GST and *rpsL* gene

A, B: *E. coli JM109*; C: protein molecular weight marker; D, E: Expressed products of *pGEX-λ T/rpsL* by IPTG.

## 2.5 含重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 的大肠杆菌对链霉素耐药性的研究

将含有 *pGEX-λ T* 质粒的大肠杆菌 *JM109* 和含重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 大肠杆菌 *JM109* 分别铺皿于 LB 固体培养基上(含氨基青霉素 100 mg/L,链霉素 10 mg/L) 37 °C 过夜培养。结果观察发现含有 *pGEX-λ T* 质粒的大肠杆菌 *JM109* 铺皿的 LB 固体培养基上,无细菌生长;而含重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 大肠杆菌 *JM109* 铺皿的 LB 固体培养基上有明显的菌落出现,细菌生长情况良好,提示含重组质粒 *pGEX-λ T/rpsL* 大肠杆菌 *JM109* 对链霉素有耐药性。

## 3 讨论

为数不多的抗结核药物大多是 30 年前发现,并且结核分支杆菌对一线抗结核药物均已产生了不同程度的耐药性<sup>[8]</sup>。结核分支杆菌的耐药性现象是所有化学疗法不可避免的规律<sup>[9]</sup>,是结核分

枝杆菌的一种变异现象<sup>[10]</sup>.

链霉素 (SM) 是一种在核蛋白水平干扰原核生物蛋白质合成的氨基糖甙类抗生素, 目前从基因水平进行研究发现结核分支杆菌对链霉素耐药性是由于编码核蛋白体亚基基因突变使链霉素不能发挥其抗菌作用所致, 主要突变部位是编码核蛋白体 30S 亚基 S12 蛋白的 *rpsL* 基因和编码 16SrRNA 的 *rrS* 基因, 可以是单基因型和/或多基因型的, 并且主要以点突变为<sup>[11]</sup>. *rpsL* 基因最常见的是 43 位氨基酸的碱基 A-G 的突变, 导致 43 位赖氨酸 (Lys) → 精氨酸 (Arg) 的转变, 有时也可见 88 位 Lys → Arg 和 43 位 Lys → 苏氨酸 (Thr) 的同时转变<sup>[12]</sup>. *rrS* 基因的突变主要集中于相当于大肠杆菌一级结构序列的 530 环区和 915 碱基区. 耐链霉素结核分支杆菌 *rrS* 基因的突变常见于 491、512、513、516、903 和 904 位碱基, 相当于大肠杆菌一级结构序列的 530 环区 501、522、523、526 位碱基和 915 碱基区 912 和 913 位碱基<sup>[12]</sup>. 耐链霉素结核分支杆菌 *rrS* 基因和 *rpsL* 基因的突变可以同时或分别出现而导致耐药<sup>[13, 14]</sup>, 并且不同的地区, 不同的菌株, 碱基突变的位置和形式均有差异.

我们在分析以前的研究结果基础之上, 推断该临床分离株结核分支杆菌对链霉素耐药的分子机制可能较为特殊, 经 PCR 扩增、序列测定该株多耐药结核分支杆菌 *rrS* 基因、*rpsL* 基因等研究表明: 该株多耐药结核分支杆菌 *rrS* 基因序列与结核杆菌 *H<sub>37</sub>Rv* *rrS* 基因序列完全相同, 没有碱基的插入、缺失或取代; *rpsL* 基因碱基序列与已知的结核分支杆菌 *H<sub>37</sub>Rv* 株 *rpsL* 基因序列相比较发现, 该株多耐药结核分支杆菌 *rpsL* 基因碱基序列在 93、94 bp 处发生了碱基的突变, 碱基 C、C 突变为 T、T, 使得相对应的编码氨基酸由脯氨酸 (Pro) 突变为亮氨酸 (Leu), 该位置碱基的突变是首次报道发现, 由此证实了我们推断的正确性. 进一步作转化鉴定等研究表明: 该株多耐药结核分支杆菌耐链霉素的分子机制仅仅是由于 *rpsL* 基因的 93、94 bp 处碱基突变所致, 是单基因型的, 说明仅仅

是由于 *rpsL* 基因的个别碱基突变也可导致结核分支杆菌对链霉素耐药, 一次突变就使该结核分支杆菌产生高水平的耐药.

#### 参考文献 (References):

- [1] PIATEK A S, TYAGI S, POL A C, *et al.* Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Nat Biotech*, 1998, 16: 359-363.
- [2] CAWS M, DROBIEWSKI F A. Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 953: 138-145.
- [3] TANIGUCHI H. Molecular mechanisms of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J UOEH*, 2000, 22(3): 269-282.
- [4] BLANCHARD J S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65: 215-239.
- [5] COLE S T, BROSCHE R, PARKHILL J, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence [J]. *Nature*, 1998, 393(11): 537-548.
- [6] HO S Y, MITTAL G S. Electroporation of cell membranes: a review [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 1996, 16(4): 349-362.
- [7] BEHR M A, GILL W P, SALAMON H, *et al.* Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray [J]. *Science*, 1999, 284(3): 1520-1523.
- [8] GILLESPIE S H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(2): 267-274.
- [9] ZUMIA A, GRANGE J M. Multidrug-resistant tuberculosis--can the tide be turned? [J]. *Lancet Infect Dis*, 2001, 1(3): 199-202.
- [10] OLSEN J E. Antibiotic resistance: genetic mechanisms and mobility [J]. *Acta Vet Scand Suppl*, 1999, 92: 15-22.
- [11] AHMAD S, UDO E E, CHUGH T D. Molecular diagnosis of antimicrobial resistance [J]. *J Med Liban*, 2000, 48(4): 203-207.
- [12] OHNO H, KOHNO S. Mechanisms of drug-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Nippon Rinsho*, 1998, 56(12): 3023-3029.
- [13] RISK A P F, JACOBS W R Jr, ALLAND D. Molecular determinants of drug resistance in *tuberculosis* [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2000, 4(2 Suppl 1): S4-10.
- [14] SEAWORTHS B J. Multidrug-resistant *tuberculosis* [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2002, 16(1): 73-105.