

中國醫藥大學  
醫學檢驗生物技術學系碩士班

碩士論文

論文題目：結核分枝桿菌 PncA 蛋白突變的特性

Characterization of the mutation region

of the *Mycobacterium tuberculosis*

PncA protein

指導教授：陳昭賢 博士、楊翠青 博士

Chao-Hsien Chen, Ph.D,

Tsuey-Ching Yang, Ph.D

學生姓名：陳玟仲

Wen-Chung Chen

中華民國 98 年 7 月

## 致謝

本論文能順利完成首先感謝我的指導老師陳昭賢博士的耐心教導，不僅僅是在兩年的研究所中提供課業及實驗方面的協助外，還給我生活上的建議以及管理實驗室的寶貴經驗。在實驗與研究方面，老師在實驗上的知識與技巧對我的研究有所助益，對於我遭遇到的困境都能給予指導和幫助，管理實驗室讓我學習到如何與人說話以及管理實驗室的器材和耗材。另外，在我著手論文時，能夠抱著耐心提供我意見並修改我的論文，讓論文更完整而嚴謹。

同時也要感謝實驗室中的所有人。林老師家的研究生與楊老師家的研究生幫助我解決一些實驗上的難題。碩士班崑銘學長、學弟闕締嘉與大學部的李由和許景翔，給予我在實驗上的幫助也是深表感謝。除了在實驗上的幫助外，在實驗室的生活點滴、言不及義的閒扯、趕作業的革命情感，因為有你們的陪伴與砥礪，讓兩年的實驗室生活變得多采多姿。

感謝口試委員提供不同的建議與指導，使這論文更趨近於完善。最後要感謝家人，提供金錢及愛心幫助我度過研究所的這段時間，你們的支持是我繼續念下去的動力來源。

## 中文摘要

對結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*, TB)的治療及防制而言,抗藥性的問題是一大隱憂,在結核病的治療藥物中,以rifampin (RMP)及isoniazide (INH)的抗藥性最令人困擾,結核分枝桿菌中,對RMP及INH具有抗藥性則稱之為多重抗藥性菌株(MDR-TB),MDR-TB往往導致治療的難度、結核病發病率及死亡率的增加。在RMP及INH的合併藥物中,pyrazinamide (PZA)是一種常被使用的一線有效藥物。在先前的研究中,已針對台灣西部近五年結核分枝桿菌抗藥性做分析,篩選出許多具有多重抗藥性菌株,本研究從中挑出78株MDR-TB,進一步分析PZA的抗藥性,以MGIT method來進行藥物感受性實驗,使用PZA的標準濃度為25-50  $\mu$ g/mL,結果發現在這些MDR-TB中有62.82% (49/78)是對PZA有抗藥性。由一些文獻資料中得知,PZA的代謝與基因所表現的蛋白有關,PncA酵素蛋白會將PZA會轉變成為pyrazinoic acid,進而抑制結核菌中fatty acid的合成,臨床上大部份PZA有抗藥性的結核分枝菌,是由於基因突變所致。

本研究從對PZA有抗藥性的MDR-TB菌株中,取33株與標準菌株H37Rv做序列比對,發現基因突變率為69.7% (23/33)。由於突變點不同,造成蛋白活性有所不同,變異在胺基酸V7F、Y34變終止碼或H57D等位置,會使活性喪失;突變在胺基酸L4W、R140C或C72R等位置,會使活

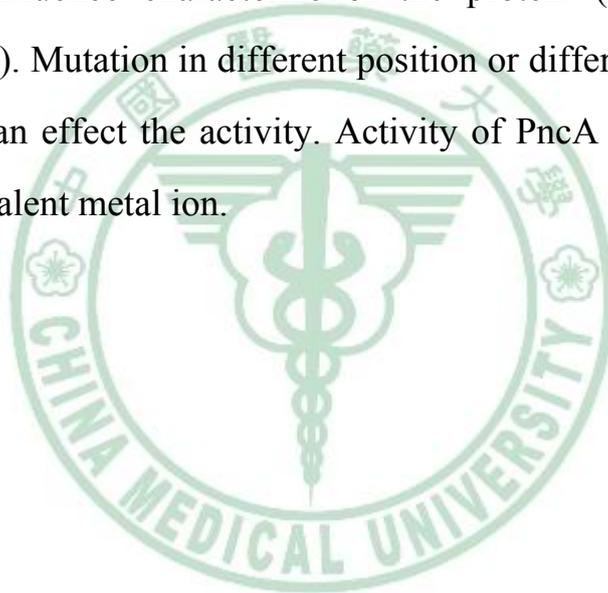
性降低；而變異在胺基酸S32R位置則對活性沒有影響，這些抗藥性菌株突變的區域集中在1-8、58-77、139-155等位置。利用資料庫搜尋，發現有三個具有功能的胺基酸區域，包括催化位(Asp8、Lys96、Cys138)、金屬結合位(Asp49、His51、His71)及cis-peptide 結合位 (Ala134、Ile133)。因此蛋白和金屬離子有關，故EDTA和不同的金屬離子會影響其活性。模擬其蛋白結構，其具有其4個 $\alpha$ -helix和6個 $\beta$ -sheet的二級結構，胺基酸變異會導致靠近金屬結合位的結構鬆散，突變點在胺基酸37或76位置，除了會使靠近金屬結合位的結構鬆散外，還會在第一個 $\alpha$ -helix多一個turn；同時突變多個胺基酸位置，會導致結構明顯的改變，如菌株78R缺少了一個 $\alpha$ -helix。推測此蛋白因分子量小，所以大部分突變會影響其蛋白特性，如：折疊及結構的改變。在不同的位置上發生突變會影響活性和結構，在同一位置上突變成不同的胺基酸也會使活性有所差異。PncA蛋白也會受到EDTA及二價金屬離子的影響。

## Abstract

Speaking of treat and provide against tuberculosis, antitubercular issue is terrible. Rifampin (RMP) and isoniazid (INH) make one puzzle in anti-tuberculosis drug. It is called Multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) that isoniazid and rifampin is resistant and MDR-TB often causes the difficulty of treatment, incidence rate increasing and mortality rate increasing. pyrazinamide (PZA) is effective first-line drug and usually synergy with RMP and INH. It is the former research of *M. tuberculosis* In the recent five years in western Taiwan, and it screens many MDR-TB strain. It pick up 78 strain in this study, and it further analysis PZA-resistance. Using MGIT method is PZA susceptibility test and standard concentration 25-50 µg/mL. PZA-resistance is 62.82% (49/78) in MDR-TB strain. Through literature review, it is correlation mode of PZA and PncA protein. Pyrazinamide is converted to pyrazinoic acid (POA) by PncA protein and POA inhibits fatty acid synthesis (FAS-II). It is majority of PZA-resistance that pncA gene mutation cause in clinical tuberculosis.

Choosing 33 strain and reference strain H37Rv compare to the sequence and rate of pncA gene mutation is 69.7% (23/33). Because the mutant of pncA gene is different, the activity of PncA protein is diverse. Mutation of position 7, 34, or 57 etc is loss activity; Mutation of position 4, 72, 140 etc decrease activity; mutation of position 32 don't effect the activity. This study is found to focus on the region of the PncA, 1-8, 58-77, 139-155. it find functional region that is catalytic site (Asp8、Lys96、Cys138), metal binding site (Asp49、His51、His71) and cs-peptide bond (Ala134、Ile133) after

researching in database. It suggests that protein relate to metal ion. The experiment discover the activity of pncA protein is influenced by EDTA or divalent metal ion. Structure simulation of pncA protein own secondary structure of four  $\alpha$ -helix and 6 $\beta$ -sheet. Mutation of position 37 (E37→G) make close structure transform loose structure after gene mutation approaching the metal binding site and add turn in first  $\alpha$ -helix. Furthermore mutation of many amino acid can cause structure to change obviously (No.78 is loss fourth $\alpha$ -helix.). It suggest the low molecular weight of protein. Major mutation can influence characterize of the protein (example: folding or structure change). Mutation in different position or different amino acid in the same position can effect the activity. Activity of PncA protein is influenced by EDTA or divalent metal ion.



# 目錄

致謝	I
中文摘要	II
Abstract	IV
目錄	VI
表目錄	X
第一章 前言	1
第一節 研究背景	5
一、分枝桿菌( <i>Mycobacterium</i> )	5
二、 <i>M. tuberculosis</i> 的傳染與致病機轉	6
三、原發性結核	7
四、續發性結核	9
五、抗藥性結核	10
六、多重抗藥性結核(MDR-TB)	11
七、 <i>M. tuberculosis</i> 的藥物治療	13
八、Pyrazinamide (PZA)	14
九、藥物機轉	17
十、 <i>pncA</i> gene	19
第二節 研究目的	20
第二章 研究方法	21

第一節 研究設計 .....	21
第二節 研究材料 .....	21
一、藥品 .....	21
二、MDR-TB 的篩檢 .....	22
(1) 抗酸菌培養 .....	22
(2) 抗酸菌鑑定 .....	24
(3) 分子生物學鑑定 .....	25
(4) <i>M. tuberculosis</i> 藥物感受性試驗 .....	26
三、PZA 的感受性試驗 .....	28
第三節 實驗方法 .....	28
一、抗酸菌培養 .....	28
(1) 痰液檢體的接種前處理 .....	29
(2) 檢體接種培養 .....	30
二、抗酸菌鑑定 .....	30
(1) 生長速度試驗 .....	31
(2) 菌落型態 .....	31
(3) 細菌體的型態 .....	32
(4) 分子生物學方法確認 .....	32
三、 <i>M. tuberculosis</i> 藥物感受性試驗 .....	34
(1) agar proportion method 操作 streptomycin、isoniazid、 rifampin、ethambutol 四種抗生素及 clofazimine 單項抗生 素 .....	34
(2) 以 BACTEC MGIT™ 960 儀器進行 pyrazinamide 藥敏試驗 .....	35

四、聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) .....	36
五、DNA 電泳 .....	37
六、勝任細胞製備 .....	38
七、質體抽取 .....	38
八、DNA 黏接反應(Ligation) .....	39
九、轉型作用 (Transformation) .....	39
十、快速篩檢 (Rapid screen) .....	40
十一、表現載體的構築 .....	40
十二、Histidine-Tag affinity gel .....	40
十三、PZase activity .....	41
(1) Whole cell suspension 活性測定 .....	41
(2) Crude extract 活性測定 .....	41
十四、金屬離子 (Metal ion chelation) .....	42
十五、疏水性群集分析 (Hydrophobic cluster analysis, HCA) .....	43
<b>第三章 .....</b>	<b>研究結果</b>
.....	45
<b>第一節 PncA 蛋白的純化及分子量 .....</b>	<b>45</b>
<b>第二節 分析定序結果 .....</b>	<b>46</b>
<b>第三節 PncA 蛋白活性 .....</b>	<b>46</b>
<b>第四節 金屬離子的影響 .....</b>	<b>48</b>

第五節 Sequence alignment	48
第六節 疏水性群集分析 (Hydrophobic cluster analysis, HCA)	49
第七節 模擬結構圖分析	50
第四章 討論	53
第五章 結論與建議	56
第一節 結論	56
第二節 建議	57
第六章 參考文獻	58
附錄一 結核藥物分類	65
附錄二、 Reported frequency of mutations in <i>pncA</i> gene from different geographical areas	66
附錄三 Hydrophobic cluster analysis	67
附錄四 實驗中抗酸菌培養作業流程	68

## 表目錄

表 一、實驗中所使用基因位點名稱及序列·····	69
表 二、在 MDR-TB 中 PZA 產生抗藥性之比例和其他文獻之比較·····	70
表 三、pncA gene 突變所佔比例和其他文獻之比較·····	71
表 四、Pzase activities of wild-type and PncA mutant proteins ·····	72



## 圖目錄

圖 一、估計結核病在全世界的發生率 .....	73
圖 二、pyrazinamide 和其抗藥性的機轉 .....	74
圖 三、PZA 的結構和其結構類似物 .....	75
圖 四、圖解 INH、PZA 和 RMP 的在 <i>M tuberculosis</i> 細胞壁作用位置	76
圖 五、PncA 蛋白會使 PZA 轉變成 POA .....	77
圖 六、質體 pQE30-pncA 之構築 .....	78
圖 七、以 pncA1 及 pncA2 為引子利用 PCR 增幅 <i>M. tuberculosis</i> pncA 基 因片段之凝膠電泳圖 .....	79
圖 八、構築質體以限制酶 BamHI 及 HindIII 切割後之凝膠電泳圖 .....	80
圖 九、SDS-PAGE 分析純化 <i>E. coli</i> Novablue (pQE30-pncA) 所表現的 PncA 蛋白 .....	81
圖 十、利用 <i>M. tuberculosis</i> H37Rv PncA 蛋白和其他突變 PncA 蛋白的 的比對 .....	82
圖 十一、在 PZA 抗藥性的結核菌株上突變點的分佈圖 .....	83
圖 十二、依照吸光值和產物變化量作標準曲線圖 .....	84
圖 十三、依照時間和產物變化量作圖 .....	85
圖 十四、加入不同濃度 EDTA 和活性的關係 & 不同的金屬離子會造成 活性之變化 .....	86

圖 十五、利用 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> PncA 蛋白和 <i>Pyrococcus horikoshii</i> PZase 蛋白作蛋白比對.....	87
圖 十六、在兩種不同蛋白利用保守的 hydrophobic residues 比對其二級結構.....	88
圖 十七、wide-type 和突變點多寡的模擬結構圖.....	89
圖 十八、wide-type 與變異在胺基酸第 76 位置的模擬結構圖.....	90



## 第一章 前言

結核病是種古老的疾病，目前仍是世界各國致死率極高的慢性傳染病之一，尤其是在未開發及開發中國家更是常見。依據世界衛生組織 (WHO) 的統計估算，在 2005 年最多的新結核病例發生於東南亞區域，佔全球發病病例的 34%，全球平均約每三人就有一人感染結核桿菌<sup>(1)(2)</sup>，其分佈可參考圖一<sup>(1)</sup>。雖然 1985 年起在台灣結核病已不在十大死因之列，但在某些地區的感染率仍未見明顯下降，且台灣身處東亞，交通的便利，人民往來密切，加上東南亞也一直是國人旅遊的熱門區域，因此，台灣疾病管制局在 2005 年起也配合世界衛生組織針對重點疾病的防疫『STOP TB Strategy』制訂了結核病十年減半計畫 (Directly Observed Treatment, Short course, DOTs)<sup>(46)</sup>，由此可知這個古老疾病受到重視的程度。在台灣，政府的實行要點為派都治計畫關懷員「送藥到手、服藥入口、吃完再走」為主要實行方向。可見結核病的預防及治療，對全世界而言亦是當務之急。

結核病是由結核分枝桿菌感染所造成的，結核菌的最大特徵是生長緩慢，約 16 至 18 小時分裂一次，因此在培養鑑定的過程便變得格外困難。當患者被懷疑有被感染的可能時，從接受驗痰(通常是先做痰液抹片再以抗酸性染色判讀)到微生物培養鑑定抗藥性的結果出來，往往需要花上一個月以上，甚至更久的時間，因此疾病的傳播便在這段防疫的空窗

期出現很大的挑戰。依據疾病管制局的資料顯示，在台灣可以發現在許多山地鄉或較鄉村的地區感染率顯然高於都市區域<sup>(43)</sup>，這與個人衛生習慣、醫療資源及其他衛生教育或許有很大的關係。傳統上國人常有服藥不確實的狀況發生，因此當發現有感染結核病的狀況發生時，便可能因為未確實服藥而使得結核菌產生抗藥性的狀況也更加嚴重，也因此疾病管制局的十年減半都治計畫中的策略便顯得十分重要，而從疾病管制局的統計數字來看，以往台灣結核病病患每年新增一萬五千人以上，但在政府實施都治計畫關懷員「送藥到手、服藥入口、吃完再走」三年後，每年新增人數已從 2005 年的一萬六千四百七十二人降到 2006 年的一萬五千三百七十八人，2007 年降為一萬四千五百五十四人，每年以百分之七以上幅度下降，除了發生率逐年下降外，三年的結核病死亡率也以每年百分之十幅度下降，成效頗佳。<sup>(43)</sup>

結核桿菌藥物感受性試驗(Drug Susceptibility Testing, DST)的結果是提供治療的重要參考，世界衛生組織在 1969 年就已經公佈結核病藥物感受性試驗的參考標準步驟，而台灣疾病管制局也有擬訂有結核病診治指引及結核菌檢驗手冊，提供做為臨床醫師診斷及臨床檢驗實驗室的參考指引，也因此使得近年來結核菌的抗藥性受到更大的重視。依據台灣疾病管制局統計，台灣有百分之一結核病患者罹患較難以治療的多重抗藥性結核病(Multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)<sup>(44)</sup>，MDR 患者中的

百分之五是廣泛抗藥性結核病(Extremely drug-resistant tuberculosis, XDR-TB)，目前難以有效醫治，死亡率仍高，目前台灣感染 MDR 的比率約為 3.8%<sup>(34)</sup>，與其他已開發國家比較是屬於偏高的狀況。依據先前實驗 MDR-TB 比率 3.7% (177/4819)接近疾病管制局的統計，所以台灣現今治療結核病除了使用 isoniazid (INH)、rifampicin(RMP)、ethambutol (EMB) 和 streptomycin (SM)外，也都會合併使用台灣目前少用，同屬於第一線治療藥物 Pyrazinamide (PZA)。

本實驗檢體來源為 MDR-TB 的菌株，利用 MGIT method 對 MDR-TB 作 PZA 的感受性試驗。挑出 56 株 MDR 菌株，PZA 的標準濃度為 25-50  $\mu$ g/mL，結果發現在這些 MDR-TB 中有 66.1 % (37/56)是對 PZA 有抗藥性，在分析對 PZA 有抗藥性的結核菌中 *pncA* gene 產生突變佔 69.7% (23/33)。

由文獻中得知，PZA 化學結構類似 nicotinamide，PZA 的代謝機轉<sup>(3)</sup>(如圖二，在後面章節會詳述)與 *pncA* gene 所表現的蛋白有關，PncA protein (又稱 pyrazinamidase/nicotinamidase)會將 PZA 轉變成為 pyrazinoic acid (POA)，POA 會抑制結核菌中 fatty acid 的合成，可對抗 semi-dormant tubercle bacilli，而且和其他藥物不同的是他必須要在酸性環境下才有作用 (pH 約為 5)。臨床上部份 PZA 抗藥性的結核分枝菌，是由於其 *pncA* gene 突變所致。

此研究探討 *M. tuberculosis* 的 *pncA* gene 與 PZA 在的關係，並探討其功能區的影響，並依照功能區影響 PncA protein 的活性。利用 NCBI 資料庫發現有金屬結合位，由不同的金屬離子測定，知其對於 PncA 蛋白有不同程度的影響



## 第一節 研究背景

### 一、分枝桿菌(*Mycobacterium*)

在 *Mycobacterium* 中可對人類直接產生疾病的有 *M. tuberculosis* 產生結核病 (tuberculosis) 及 *Mycobacterium leprae* 引起痲瘋 (Leprosy)。目前痲瘋的感染已近乎絕跡，但結核分枝桿菌的感染卻有增加的趨勢。所以針對 *M. tuberculosis* 的檢驗便愈形重要在 *Mycobacterium* 中主要分為 *M. tuberculosis* 及 Non tuberculosis *Mycobacterium* 二類，*M. tuberculosis* 早在 1882 年即被 Robert Koch 發現提出，整個基因體定序則在 1998 年完成<sup>(4)</sup>

*M. tuberculosis* 屬於革蘭氏陽性菌，長約 1-10 $\mu$ m，寬 0.2~0.7  $\mu$ m，外觀為略彎曲的細長桿菌，無鞭毛、無芽胞、無莢膜，有時呈現多形性，如近乎球形或長鏈狀。細胞壁富於脂質而會妨礙色素的通過，因而不易染色。但 *Mycobacterium* 一旦染色，不易被強酸脫色，故又稱抗酸菌(acid-fast bacilli)。*M. tuberculosis* 為生長緩慢的絕對需氧菌，培養最佳溫度為 37°C，適宜的酸鹼度為 pH6.4-7.0。*M. tuberculosis* 的分裂速度很慢，約每 20 小時分裂一次。構成 *M. tuberculosis* 性狀特徵的成分是脂質，佔乾燥菌體重量之 40%。細胞壁成份具增強免疫反應能力特性等生物活性，脂質約佔 60%。結核菌對外界抵抗力甚強，在陰暗處 *M. tuberculosis* 可生存 2~3 個月不

死，若是日光直接照射或用 5% 石碳酸處理 *M. tuberculosis*，仍需 24 小時以上方可將其殺滅

*M. tuberculosis* 的培養常用 Lowenstein-Jensen Slant (L-J slant)，成份中含有孔雀綠 (Malachite Green) 可以抑制其他雜菌的生長。在 37°C 的環境下約 20 小時分裂一次，培養 2-3 週後可見菌落生長，約 4~8 週後才可見到明顯的生長菌落。由於分枝桿菌的生長週期長、陽性檢出率低、不易標準化等缺點，致使常規細菌學檢查方法不具時效性，無法充分滿足臨床診斷的需要。近來也有以 Middlebrook 7H9 為 base 的液體培養基之全自動分枝桿菌培養鑑定儀協助抗酸菌的培養偵測，可做為分枝桿菌快速培養與鑑定藥物試驗的國際標準方法<sup>(25)</sup>

## 二、*M. tuberculosis* 的傳染與致病機轉

*M. tuberculosis* 的傳染主要是以飛沫傳染(droplet)為主。當帶菌者吐痰或藉由在公共場所講話、咳嗽、唱歌或大聲談笑時產生的飛沫而排出 *M. tuberculosis* 菌體，飛沫在塵埃中乾燥後，殘核飛揚飄浮在空中，直徑小於 5  $\mu$ l 的飛沫殘核(droplet nuclei)便可經由呼吸道到達正常的肺組織中而造成感染。然而結核病傳染的另一特徵是感染很難發生，因為 *M. tuberculosis* 並不易到達肺的末梢部位。因此傳染最常發生在較親近且較長時間的接觸者或家人<sup>(44)</sup>。

感染結核菌者只有約 10-20%會發病，其餘的人都平安無事渡過一生，因此「感染與發病不同」是必須要了解的常識。WHO 認為胸部 X 光診斷的信賴度不高，因而將結核個案定義如下：(1)疑似結核個案為呈現暗示結核病症狀與病徵之任何人，尤其是超過三週長期咳嗽；(2)結核病個案經由細菌學檢驗證實或由醫師診斷之病人（任何給藥治療的病人都要記錄為個案，用藥試試看絕不可作為診斷的方法）；(3)確診結核個案為 *M. tuberculosis* 培養陽性之病人（在不能例行培養 *M. tuberculosis* 之國家，痰液抹片 acid fast stain 結果兩次陽性者，亦可考慮為「確診」個案）。結核病的臨床表徵為咳嗽超過 3 週以上、發燒、貧血、夜間盜汗、體重減輕等，並無特別具有特異性的表徵出現。結核病患者也常見有感冒、糖尿病、癌症等疾病，因此臨床症狀不易分辨，而需進一步以實驗室方法鑑定後確診<sup>(44)</sup>。

*M. tuberculosis* 感染人體後會導致發病，主要有三個因素：(1)*M. tuberculosis* 本身的致病力；(2)患者免疫過敏反應能力之強弱；(3)組織破壞與乾酪性壞死之致病機轉。*M. tuberculosis* 可入侵任何器官，但主要還是以肺部為主，非感染肺部的結核病稱之為肺外結核。

### 三、原發性結核<sup>(44)</sup>

當 *M. tuberculosis* 進入人體被吸收後，在感染部位被嗜中性白血球及肺泡巨噬細胞吞噬而造成滲出性病灶，就是初次感染病灶。人

體內的免疫反應在菌體侵入後會啟動而促使巨噬細胞進行吞噬作用，但 *M. tuberculosis* 在巨噬細胞內並不被殺滅，反而會進行暫時性胞內寄生並增殖。巨噬細胞破裂時會散出細菌，或隨巨噬細胞經由血液和淋巴液散佈於宿主体內其他組織器官。當許多的巨噬細胞聚集於病灶處，會形成特殊的肉芽腫組織，此稱之為結核(tubercle)，這便是原發性結核(primary tuberculosis)。原發肺結核在肺部之進行通常依四種方式：(1)肺部感染；(2)肺門淋巴腺病變；(3)肋膜腔積水；(4)粟粒狀結核<sup>(44)</sup>。

原發性結核亦可以單獨一種或合併多種方式表現。原發性感染通常會持續數星期，在初期時 *M. tuberculosis* 生長快速且極易傳播，當患者的免疫系統漸漸發展出細胞性免疫，使病菌的增殖速度減緩，經常造成無病狀的原發性；但在兒童、老年人或免疫缺損的人(如愛滋病患者)易引起有症狀的原發性結核症。當結核病變發生退行而病灶變小時，感染即進入潛伏期，亦即感染持續存在，但不引起疾病，潛伏性感染可在免疫力下降時重新活動，也可以潛伏一生。

#### 四、續發性結核<sup>(44)</sup>

許多患者在原發性結核休眠一段時期後，可能由於營養不良、酗酒、生活壓力、緊張、老化或帶菌者的免疫力降低等因素，而造成結核病的再活化，此種狀況稱為續發性結核症 (secondary tuberculosis)，續發性結核症患者的細胞免疫結果會對宿主造成傷害，而引發遲發型的過敏性反應，使結核組織壞死、纖維化及鈣化，此為續發性肺結核的特徵。病發時，乾酪樣病灶會被液化，形成之空腔可提供 *M. tuberculosis* 快速繁殖的地方。大量的 *M. tuberculosis* 可經由支氣管，擴散至肺的其他部分，並藉由痰或飛沫傳染給其他人，成為開放性結核病人。一般肺結核患者常有之症狀為衰弱、倦怠、體重減輕、低度發燒、夜間盜汗、慢性咳嗽及咳血。若因續發性感染壞疽軟化，腐蝕了肺部組織，*M. tuberculosis* 會因此而進入血流及淋巴，隨著便會散布到肺的其他部位或其他器官，而形成小的粟粒結核(即類似肉芽腫)，並在全身擴散，包括腎臟、心臟、骨骼及腦組織等最為常見，稱為粟粒狀結核症 (miliary tuberculosis)，亦即肺外結核病(extrapulmonary tuberculosis)。此時若未及時用藥物控制，死亡率會特別高。

## 五、抗藥性結核<sup>(44)</sup>

近年來結核病的防治一直都是台灣公衛政策的重要議題之一，台灣地區施行全國結核病防治計畫（National Tuberculosis program, NTP）已經超過五十年，疾病盛行率和死亡率已有明顯的下降，同時也由於治療方法的演進，不僅治療時間可縮短至六個月，且治療成功率可高於95%，而復發率小於5%，只要配合療程，肺結核已不再是令人為之色變的可怕疾病。但由於抗藥性*M. tuberculosis*的產生，使得肺結核的治療，再度充滿許多困難。*M. tuberculosis*對抗結核藥物產生抗藥性的原因是由於染色體上的基因產生突變所致。在自然狀態下，產生此種突變的機率極低：如isoniazid約為 $10^{-6}$ ，rifampin約為 $10^{-8}$ 。同時，基因對不同藥物產生抗藥性的突變機會為互不相干的獨立事件；亦即要同時對isoniazid及rifampin產生抗藥性，須總菌量達 $10^{14}$ 才有機會發生；但空洞性病灶的菌量約僅為 $10^8$ ，故病患若接受規則的至少含有isoniazid及rifampin的化學藥物治療，並不易因治療失敗而產生抗藥性菌株。但若接受不適當的藥物治療，則可能造成自然存在的少數抗藥性*M. tuberculosis*經由藥物篩選而大量繁殖，導致抗藥性的產生。在結核病化學藥物治療的時代，影響結核病治療成功與否的重要因素，已不再是休息、療養、飲食、氣候或疾病嚴重程度，乃取決於處方藥物組合是否適當、治療期間

是否足夠及病人是否按規服藥。1990 年代，鑑於世界各國逐漸忽視結核病問題導致治療失敗、抗藥性結核病流行、及全球性的結核病回升趨勢，世界衛生組織鼓吹各國積極推動DOTs，以標準治療方式，直接監督治療，「送藥到手，服藥入口，吞了再走」。抗藥性結核菌逐漸增多的今日，結核病的治療絕不是依標準治療方式處方給藥就了事，而必須隨時注意病人的治療順服性，保證有效的藥物進入病人體內發揮了藥效，才可能在最短的時間內治癒結核病，早日消滅傳染源，也才可能防止抗藥性結核菌的持續增加。*M. tuberculosis*的藥物感受性試驗，主要有三個目的：(1)決定最初的用藥選擇；(2)確定抗藥性的發生，而選擇進一步的用藥；(3)估計社區內抗藥性原發與後天的感染率。*M. tuberculosis*藥物感受性試驗，必須對於所有病人，初次分離到的菌株都需要做。而且，當病人接受治療後三個月仍呈現陽性培養結果，或臨床證據顯示治療反應失敗，則藥物感受性試驗便需要重覆進行<sup>(44)</sup>。為了確保在最快時間內得知抗藥性的偵測，快速的藥物感受性試驗需與快速的培養及鑑定結果配合，以做為提供臨床即時治療的良好依據。

## 六、多重抗藥性結核(MDR-TB)

經培養確認為 *M. tuberculosis* 感染並進行藥物敏感性試驗後發現至少同時對 isoniazid(以 2  $\mu$  g/ml 為判斷標準)及 rifampin(以 1  $\mu$

g/ml 為判斷標準)二種第一線藥物具有抗藥性時，此種狀況稱之為 MDR-TB。若更嚴重進一步對任何 fluoroquinolone 藥物有抗藥性，且對於 3 種注射型的抗結核病二線藥物 (capreomycin, kanamycin, amikacin) 中至少 1 種出現抗藥性者，就會成為所謂廣泛抗藥性結核菌(Extensively drug resistant tuberculosis, XDR-TB)，XDR-TB 的出現無異使結核病防治上更加困難，治療上比 MDR-TB 更為棘手，一旦被感染，其治療成功率有可能會降至 50%以下。

造成多重抗藥結核病的原因很多，根據美國 National Jewish Center 統計，80%的多重抗藥病人在治療過程中出現錯誤，平均每個病人發生 3.93 個。在醫師處方中常見可能導致抗藥性結核的狀況如：(1)針對活動性結核病人施行預防治療。(2)未依標準處方及劑量開立結核藥物。(3)未注意到病人服藥順服度不佳，或雖知道但未採取行動。(4)未注意到病人已經罹患抗藥結核病。(5)在失敗的處方每次新增 1 種藥物。(6)過度信賴 streptomycin 及 fluoroquinolone，誤以為已使用 2 種新藥，卻忽略了 streptomycin 無法在 18-24 個月的療程中全程使用，以及 streptomycin 可能與 isoniazid 共同出現抗藥的問題。

與病人有關的狀況如：(1)服藥順從度差，導致續發性多重抗藥菌株的產生。(2)因藥物副作用導致不規則服藥。(3)遭原發性多重抗

藥菌株感染。(4)遭 NTM 感染。(5)因肺生理結構扭曲所導致的生理性抗藥 (Physiological resistance)。

## 七、*M. tuberculosis*的藥物治療

Waksman 於 1944 年發現了鏈黴素(streptomycin)後，開啟了結核病化學藥物治療的新紀元。1949 年發現合併使用多種抗結核藥物來治療結核病的重要性，否則極容易發生 *M. tuberculosis* 續發抗藥性而導致治療失敗。1952 年發現 isoniazid。1956 年，證明在有效抗結核藥物治療之下，結核病人居家治療並不會增加家人受到感染的機會，傳統花費頗高的療養院療法於是漸漸淡出流行。1962 年發現每週 2 至 3 次間歇治療可達到同樣的治療效果。1972 年發現含有 rifampin 及 isoniazid 之合併治療，可在 1 年以內即治癒結核病，短程治療已蔚為結核病治療的主流<sup>(25)</sup>。目前第一線用於結核病治療的藥物介紹如下：

isoniazid：本藥物的藥理作用為干擾結核菌脂質及核酸的合成，對快速增殖的結核桿菌特別有效，能殺死細胞內外生長繁殖的結核菌，CNS 穿透力良好，具有安全、便宜、易於投藥等優點，是目前使用最廣泛的抗結核藥物之一，如圖四。

rifampin：本藥物的藥理作用為可抑制 *M. tuberculosis* RNA - polymerase 的活性，具殺菌能力且對吞噬細胞(macrophage)具有良好

的穿透力，可殺死細胞內的桿菌，如圖四。

ethambutol：本藥物的藥理作用為可抑制結核菌蛋白質的合成和破壞細菌的代謝，因而阻斷細菌的增殖。可避免*M. tuberculosis*產生抗藥性，為目前抗結核藥物中最常用的抑菌劑。

streptomycin：本藥物的藥理作用為對細胞外的鹼性病灶中之*M. tuberculosis*具殺菌性，適用於間歇性治療。

pyrazinamide：為Nicotinamide類似物(analogs)，對巨噬細胞內酸性(pH5.5)環境中生長緩慢的結核菌最具殺菌力，組織穿透力佳，具滅菌功能 (sterilizing activity)，故能減少結核病的復發率，為現代短程化療方案中的主要藥物之一，但對*M. bovis*及部份非結核分枝桿菌則沒有作用，如圖四。

目前在台灣針對 *Mycobacterium* 的相關檢驗及研究都已有相當深入的探討，但近年來由於微生物基因研究方法的不斷進步，使得我們得以更進一步探討微生物產生的各種變異，加上目前抗藥性問題給衛生防疫所帶來的困擾，使得我們希望透過區域性的菌株流行病學、臨床檢驗技術及基因探討能夠在這一類難以培養菌株的臨床診斷上提供一個參考的平台，而促使我們針對 MDR-TB 進行各方面更深入探討的動力來源。

## 八、Pyrazinamide (PZA)

1936 年首次被兩位 Dalmer 和 Walter 合成<sup>(5)</sup>；在 1952 年才被發現 PZA 可以成為抗結核治療的藥物；但是 PZA 在第一線結核治療藥物被廣泛使用則是在 1980 年代<sup>(22)</sup>。CAS 命名為 Pyrazinecarboxamide；一般別名為 pyrazinoic acid amide 或 pyrazine carboxylamide 分子式為  $C_5H_5N_3O$ ，分子量為 123.11，熔點 188~189 °C，溶於 chloroform，methylene chloride；微溶於 benzene；在室溫難溶於水。以結構而言，PZA 和 INH 有一些相似的特性：第一、為菸鹼胺(nicotinamide)的相似物<sup>(6)(7)</sup>，如圖三。第二、對 *M. tuberculosis* 具有專一性的殺菌力。<sup>(22)</sup> 但是此藥物在體外正常的培養環境下是無法殺死 *M. tuberculosis*，又如何被發現可以用來當作結核的治療藥物？在 1945 年，chorine 發現 nicotinamide(vitamin B3)對於 *M. tuberculosis* 具有抑制的活性。在 1948 年在 Lederle Laboratories of American Cyanamid 也發現此一現象。同時在 Lederle Laboratories 和 Merck laboratories 發現經由合成 nicotinamide 的類似物，pyrazinamide，在已感染 tuberculosis 的動物具有最好的殺菌力。研究 nicotinamide 的類似物也得到了二種有效的抗結核藥物，isoniazid(INH)和 ethionamide。<sup>(3)</sup>

使用此藥物可以使原本治療結核病的療程 9 至 12 個月，縮短至 6 個月<sup>(8)(9)</sup>，但通常每天服用 PZA 高於 40mg/kg，易產生肝毒性<sup>(10)</sup>

PZA 為重要的殺死結核菌的藥物屬第一線口服用藥(附錄一),他只有在酸性(pH 值約 5.0)環境下才有作用,此藥物會滲透到結核菌內,被酵素 nicotinamidase / pyrazinamidase (PZase)代謝成 pyrazinoic acid (POA),被一較弱的攜出幫浦或擴散出胞外,帶負電的 POA 分子會在酸性環境下形成不帶電的分子 HPOA, HPOA 容易進到細胞內累積,進而導致細胞損傷。並不像其他的藥物, PZA 無特定的作用標的物(target),而且作用在靜止期(stationary phase)的細菌比對數期(exponential phase)的細菌來的有效。POA 也會去影響酵素 fatty acid synthesis I 的作用,進而去影響脂肪酸的合成(如圖二),而且在膜上發現 POA 的標的物, POA 對結核菌具有感受性,但是對於 *Mycobacterium smegmatis* 或其他細菌,如: *E. coli*, 則是天生抵抗 POA 的作用<sup>(19)(20)</sup>

產生 PZA-resistance 的結核菌,其主要的的原因是 *pncA* 基因產生突變,導致 PncA protein(PZase)沒有活性,進而產生抗藥性<sup>(13)(14)(15)</sup>。此藥物並不會受到其他結核藥物的影響。和 isoniazid 和 rifampicin 有很強的協同性(synergy),所以常一起被使用, PZA 是一種基礎治療 MDR-TB 藥物<sup>(13)</sup>。

形成 pyrazinoic acid 還可以進一步被酵素 xanthine oxidase 氧化成 5-hydroxypyrazinoic acid。而且此藥物在血中的半衰期和治療長短

無關，顯示出 PZA 不會誘發代謝它的酵素反應。PZA 誘發的毒性機轉是未知：目前還未知是否和酵素的毒性相關，也不知道 PZA 的毒性是由藥物本身或是其衍生物產生。在老鼠的研究中指出 PZA 抑制許多 CYP450 isoenzymes (2B, 2C, 2E1, 3A) 活性，但是在人類的肝的微粒體，PZA 對 CYP450 isoenzyme 則無抑制的現象。<sup>(10)</sup> 此藥物實際上在體外是不具有殺菌能力而且對在病人體內快速生長的桿菌只有前兩天的治療有效。<sup>(3)</sup>

通常被用來作為抗 PZA 的分枝桿菌為 *M. bovis* BCG，此菌的 *pnc* A 基因在第 169 個核苷酸突變，原本的 C 變成 G。<sup>(21)</sup>

使用此藥物副作用會使肝功能不良（發燒、食慾不振、身體不適、肝腫大、腹部壓痛及黃疸等）、尿酸值上昇、痛風發作（關節痛）、貧血、對光敏感、皮膚出疹、胃部不適、頭痛、肌肉痛及色素沈著等。

## 九、藥物機轉

此一 PZA 模型是基於最近的文獻所得，如圖二。PZA(前驅物)藉由被動性的滲透或者可能是主動的運輸進到細菌體內，經由 PZase 轉變成具有殺菌力的 pyrazinoic acid(POA)，POA 在 *M. tuberculosis* 內藉由被動的滲透或流出機轉(*M. tuberculosis* 缺乏的)到細菌體外，如果細菌體外為酸性環境，一小部分的 POA 負電的分子在細菌體外

會和質子結合形成不帶電共軛酸的形式(HPOA)，此型式容易通過細胞膜。理論上 HPOA 會重新進入細菌體內。HPOA 的進入會比 POA 流出還要快，所以 POA 會累積在細菌體內，質子化的 POA (HPOA) 會帶一質子進入細菌，而後解離成一質子(H<sup>+</sup>)和一帶負電的 POA，質子會留在細胞內會導致細胞質酸化，一些重要的酵素會被抑制，帶負電的 POA 會經由被動的滲透或流出機轉到細菌體外，一直重複此循環，進而殺死 *M. tuberculosis*。質子化的 POA 可能會瓦解 proton motive force 質子驅動力和影響細胞膜的運送功能。在中性或鹼性的環境下只有少部分的在細菌體內，因為超過 99.9% 的 POA 以帶負電的形式不容易通過細胞膜。

非特定的結合也可以幫助解釋 PZA 對老化的及不分裂的細菌有較好的殺菌能力。一般藥物會結合在特定位置而打斷重要的代謝步驟，而且總是對抗生長期的細菌效果比位於靜止期的細菌好。靜止期細菌會降低細菌的代謝，使流出機制功能變慢，以至於 POA 更容易累積在細菌體內，而且細菌的膜電位會降低，使 HPOA 更容易進入細菌體內，累積在細菌體內。發現 PZA 或 POA 可以抑制 fatty acid synthase-I (Fas-I) 的作用。

INH 和 PZA 皆為抑制 *M. tuberculosis* 的細胞壁 mycolic acid 的合成，但是 PZA 影響短鏈脂肪酸合成(FAS I)，INH 影響長鏈脂肪酸合

成(FAS II)，RMP 抑制 *M. tuberculosis* RNA - polymerase 的活性。

## 十、*pncA* gene

由 561 個核苷酸所組成，轉譯出 186 個胺基酸的 PncA 酵素蛋白，所合成之酵素可以把 PZA 轉變成 POA，如圖五。此酵素在原核生物普遍存在。所產生 PncA protein 預測大小為 19.8 kDa，屬於 cysteine hydrolases superfamily (isochorismatase family)。由文獻得知 *M. tuberculosis* PncA 蛋白和 *Pyrococcus horikoshii* Pzase 的相似度有 37%。其蛋白結構，依據生物資訊預測(如：NCBI、ExPASy 等)具有 metal-binding site (H51, H71, D49)、active site (D8, K96, C138)和 conserved cis-peptide bond (A134, I133)。

由附錄二，從不同的地區統計 PZA 產生抗性中，同時 *pncA* 基因發生突變的比例，發現突變比例幾乎都高於 70%，顯示出 *pncA* 基因突變是造成 *M. tuberculosis* 對 PZA 產生抗藥性的主要機轉。而且突變並沒有發生在特定的區域，反而是分散在基因裡。依據文獻所統計的結果突變比較集中於三個蛋白區域，分別是 3 - 17、61 - 85 和 132 - 142。PncA 酵素蛋白在這些區域很可能包含 catalytic site。

## 第二節 研究目的

- 一、探討PZA在*M. tuberculosis*的作用。
- 二、探討基因突變的特性
- 三、確定在PncA protein是否失去活性。
- 四、探討金屬離子對於PncA蛋白活性的影響
- 五、利用生物資訊的功能分析PncA蛋白結構和活性之關係



## 第二章 研究方法

本實驗內容是以MDR-TB菌株分析PZA的感受性試驗，對於產生pyrazinamide的抗藥性的結核菌，進一步分析其核酸及蛋白序列的差異，是否會影響其蛋白活性與蛋白結構，和不同的金屬離子反應後是否也會造成活性的改變。再利用生物資訊，解析其蛋白結構，觀察其結構差異，並探討和活性之關係。

### 第一節 研究設計

從MDR-TB的先前研究中，利用MGIT method進行PZA藥物感受性試驗，篩選出對於PZA有抗藥性的菌株，比對其基因的差異。利用有所差異的基因，表現其蛋白，比較其活性差異。由資料庫搜尋，推測蛋白有金屬結合位，因此加入不同濃度的EDTA和不同的金屬離子，觀察是否會影響其蛋白活性。利用結構的方式是否能夠解釋期活性差異。

### 第二節 研究材料

#### 一、藥品

一般無機鹽與有機溶劑均為分析級，除非特別標示，皆購自於USB公司(USA)及Sigma chemical公司(Missouri, USA)。限制酶及其他酵素購自TAKARA公司(Japan)。聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)所使用之耐熱DNA聚合酶Taq DNA polymerase購自Yeastern Biotech公

司。洋菜膠(agarose)購自Sigma chemical公司(Missouri, USA)。回收純化蛋白質之Nickel Affinity Gel 購自Sigma chemical公司(Missouri, USA)。

## 二、MDR-TB的篩檢

收集台灣台中市芮弗士醫事檢驗所於2003年7月至2007年6月進行抗酸菌培養、鑑定及藥物感受性試驗之所有臨床檢體進行分析，以取得MDR-TB檢體做為後續相關分析檢體來源。樣本來源北起基隆市，南至屏東縣，含括台灣西部各縣市，收集單位包含區域級醫院、地區級醫院、診所及檢驗所等，於P2級負壓實驗室中進行抗酸菌培養、鑑定及*M. tuberculosis*藥物感受性試驗。取得MDR-TB檢體的過程主要分為抗酸菌培養、抗酸菌鑑定、*M. tuberculosis*藥物感受性試驗三大類

### (1) 抗酸菌培養

*M. tuberculosis*為*Mycobacterium species*中的其中一種菌，屬於抗酸性菌，*Mycobacterium species*中又可分為快速生長菌及慢速生長菌，為了避免遺漏故先培養出抗酸菌後，再將陽性樣本鑑定是否為*M. tuberculosis*。

由於抗酸菌的生長特性與一般細菌不同，因此培養抗酸菌傳統上是以L-J slant做為培養基的選擇<sup>(28)</sup>，但由於以L-J slant進行抗酸菌

培養時，陰性報告需費時56天，陽性報告也約需要21天以上才可得知結果，這對*M. tuberculosis*這種屬於法定傳染病臨床診斷上的協助便受到時間的限制，因此，利用以Middlebrook 為基礎的液體培養基 (Mycobacteria Growth Indicator Tube ; MGIT)<sup>(28)</sup> 做為抗酸菌培養的培養基選擇，配合自動化儀器(BACTEC MGIT 960 System)的偵測可以大幅縮短抗酸菌培養的陰性結果確認時間為42天<sup>(30)</sup>，且陽性報告的時間也縮短至平均約為12天，本實驗便選擇MGIT做為培養基並利用 BACTEC MGIT 960儀器進行偵測<sup>(28). (29)</sup>。

MGIT的偵測原理為：MGIT試管內含有豐富的養份Middlebrook 7H9 broth、及Ruthenium含氧分子的螢光劑，並外加生長增殖液 OADC (oleic acid、albumin、dextrose、catalase) 與PANTA (polymyxin B、amphotericin B、nalidixic acid、trimethoprim、azlocillin) 抗生素避免其他細菌的污染。在MGIT瓶子底部有16 x 100 mm的矽酮樹脂，裡頭含有螢光化合物。最初，大量分解出來的氧抑制了螢光，所以只能偵測到少量的螢光，之後，大量的微生物呼吸運動將培養管內的氧氣消耗，管底的螢光指示劑將在內置紫外激發光的照射下發出螢光，螢光強度變化直接反應培養管內*Mycobacterium*生長狀態。主機的photo detector偵測螢光強度後，直接以警示燈及警示聲告知，同時LCD螢幕出現陽性測試報告。反應原理如圖一，當MGIT

管置入BACTEC MGIT 960系統中之後，便持續培養在37°C且每60分鐘會偵測一次增加的螢光量，經過電腦處理系統分析後，判斷管內分枝桿菌的生長情況。當螢光強度呈現加速度變化時，系統將以生長單位「GU」形式報告該標本為陽性，若持續未呈現陽性反應，最少42天，則將其視為陰性反應。MGIT管中添加BACTEC MGIT生長補充劑，可提供分枝桿菌快速生長所必須要的物質，油酸(oleic acid)除了會被*M. tuberculosis*利用之外，在*Mycobacterium*的代謝上也扮演極重要的角色。albumin屬於保護劑，因為它會與游離脂肪酸結和，而游離脂肪酸對*Mycobacterium*來說具有毒性，所以添加albumin可以提高*Mycobacterium*的培養率。Dextrose是能量來源。catalase可以破壞可能存在培養基中的有毒過氧化物。為降低污染的發生，在接種臨床檢體之前，必須在含有MGIT液體培養基的MGIT管中加入MGIT生長補充劑以及MGIT PANTA混合抗生素以避免來自檢體的污染(31)。

## (2) 抗酸菌鑑定

近幾年來，由於如愛滋病肆虐，人類感染多種NTM的病例急速增多，加上環境空間或平常用水中便含有NTM菌株的存在，因此NTM感染人體的機率便大為增加。然而，由於許多發生在肺部的NTM感染在臨床症狀與胸部X光的表現很容易與肺結核混淆。此

時，需要正確的培養與鑑定來區別。*Mycobacterium*可分為結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis* complex , TB complex)和NTM兩大類。TB complex包含*M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. microti*、*M. africanum*及*M. canetti*。NTM又可依生長速度分為快速生長菌群(七天以內可形成菌落)和緩慢生長菌群(七天以上形成菌落)<sup>(28)</sup>。TB complex常見者為*M. tuberculosis*和*M. bovis*。*M. tuberculosis*是人類肺結核之主要病原菌，約佔85%的人體*Mycobacterium*感染，也是最急需要鑑定出來的菌種<sup>(29)</sup>。

抗酸菌的鑑定除一般細菌的特性觀察外，標準方法為利用生化反應來進行鑑定。細菌一般特性觀察包含生長速率、產色性、染色型態等，生化反應則以niacin test及nitrate reduction二項試驗做為鑑定的依據。若無法確認時再以分子生物學方法或近來研發利用*M. tuberculosis*的分泌性蛋白來進行抗酸菌鑑定，主要是目的是可將*M. tuberculosis*正確的分離出來。

### (3) 分子生物學鑑定

*Mycobacterium*分子生物學方法鑑定優點是可以快速鑑別檢體中是否含有*M. tuberculosis*的DNA，可將傳統法耗時2-4星期縮短鑑定時間至一天，但缺點是操作複雜也須額外的裝置和設備而且死菌或活菌的DNA皆會偵測出來，因此此類方法適合在培養陽性後的檢體進

行 *M. tuberculosis* 的鑑定確認，其原理是利用 Strand Displacement Amplification (SDA) 放大技術來偵測檢體中微量致病菌之遺傳物質 DNA，SDA 反應須要有待測微生物 DNA、引子、聚合酶(Polymerase)、限制酶(Restriction Enzyme)及 dNTP；與一般 PCR 不同的是：SDA 增加限制酶及 dNTP 中 dATPa 位置上的磷(P)置換成硫(S)，髮夾狀(Hairpin)探針，兩端標有兩種不同螢光染劑，一為 Fluorescin 與 Rhodamine，兩者在近距離時不產生任何螢光，但在遇到檢體中之 Target DNA 時，經由引子和 DNA 探針發生之融合(hybridize)與拉長(elongation)反應，而使兩股 DNA 分子上探針標記之螢光染劑因切割而分離。此時，能量的轉移(energy transfer)造成 fluorescin 產生螢光，此一連串 DNA 序列放大之過程產生螢光訊號經 detector 連續偵測之後，由儀器判定為陽性反應。

#### (4) *M. tuberculosis* 藥物感受性試驗

利用 Canetti 等人所建立的標準方法比例法(agar proportion method)針對 *M. tuberculosis* 進行藥物感受性試驗<sup>(36)</sup>，此方法為目前被使用最為廣泛的方法，其是以 Middlebrook 7H10 Agar 為基質，能定量待測結核分枝桿菌所佔的比例，在美國被認定為標準測試方法。利用目前常用的第一線抗結核藥物進行試驗，共有四種，包含 streptomycin、isoniazid、rifampin、ethambutol 等四種藥物，所使用濃

度如表一內容所示，除rifampin為單一濃度1.0 ug/ml外，其餘三項藥物皆包含有高、低二種濃度，streptomycin低濃度為0.2 ug/ml，高濃度為1.0 ug/ml，isoniazid低濃度為2.0 ug/ml，高濃度為10 ug/ml，ethambutol低濃度為5.0 ug/ml，高濃度為10 ug/ml。

除了以比例法針對streptomycin、isoniazid、rifampin、ethambutol等四種藥物進行*M. tuberculosis*的藥物感受性試驗外，也以BACTEC MGIT™ 960儀器利用pyrazinamide藥敏試劑組操作pyrazinamide的藥物感受性試驗，所測試藥物濃度為100 ug/mL。以BACTEC MGIT™ 960儀器操作本項藥物的原因為pyrazinamide必須在弱酸性的環境下進行測試，與比例法是在弱鹼性的環境下測試不同，因此利用自動化儀器協助藥敏試驗的操作除了可以增加標準化外也可以在十天內便獲得藥物感受性試驗的結果。

目前在結核分枝桿菌的治療上還是以常用的第一線藥物以目前常用於治療的第二線藥物，但抗藥性已悄然的產生，因而有MDR-TB及XDR-TB菌株的出現，因此我們也希望能在目前常規使用的藥物外，也可再發現有利於治療結核分枝桿菌的藥物，因此，我們利用agar proportion method的方法同時操做了clofazimine此項藥物來針對結核分枝桿菌進行藥物感受性試驗，選用此項藥物的原因是此藥物應用於癩瘋桿菌的治療，由於癩瘋桿菌與結核分枝桿菌是目前會感

染人類後致病的主要抗酸菌，希望此項藥物也能有效用於治療 *M. tuberculosis*。

### 三、PZA的感受性試驗

使用BACTEC MGIT 960系統與BACTEC MDIT 960 PZA套組搭配，是一種測試抗分支桿菌藥物PZA耐受性試驗的非放射線方法。

BACTEC MGIT 960 PZA培養基是含有調整過之Middlebrook 7H9 Broth的試管，可用來支持分枝桿菌的生長與偵測，且其pH值降低為5.9。BACTEC MGIT960 PZA培養基試管含有螢光化合物，被埋在16x100 mm圓底試管底部之矽膠內，螢光化合物對溶於培養液中氧氣的出現具敏感性，最初溶解氧氣的濃度會消弱化合物的放射，可被測的螢光很少，之後，活躍生長和呼吸的微生物會將氧氣消耗，使化合物可發出螢光。

BACTEC MGIT 960 PZA套組是一個需時4 - 21天之定性試驗，此試驗是根據比較 *M. tuberculosis* 菌株在含藥試管及不含藥試管〈生長對照，Growth Control〉之生長情形。BACTEC MGIT 960 儀器持續監控試管內螢光的增加，儀器利用比較在含藥試管內螢光與生長對照試管內螢光之分析來判定耐受性的結果。

## 第三節 實驗方法

### 一、抗酸菌培養

抗酸菌培養詳細作業流程如附錄四。

### (1)痰液檢體的接種前處理

抗酸菌培養的目的是要分離出抗酸菌後加以鑑定，本項培養最常使用的檢體為痰液，黏稠且含有許多的常在菌叢存在，因此培養前便需要先將檢體液化及除去正常菌叢的污染干擾，本實驗所使用的消化去污染的方法為 N-Acetyl-L-Cysteine-Sodium Hydroxide (NALC-NaOH) 法。NALC 用於迅速液化痰，NaOH 用於去污染（最後濃度約為2%），trisodium citrate 用於結合檢體內可能存在的重金屬離子，防止重金屬離子抑制NACL 的活性。

NALC-NaOH的泡製方法<sup>(42)</sup>為先配製4% NaOH 溶液及配製2.6% sodium citrate anhydrate 溶液(或2.9% sodium citrate dehydrate)，將4% NaOH 及2.6% sodium citrate 溶液等量混合後滅菌，於使用前加入NALC 粉末，使其濃度為0.5%。

檢體的接種前處理方法為先取少於10 mL 檢體裝入50 mL 塑膠離心管，加入等量NALC-NaOH溶液，蓋緊蓋子，開始計時30 分鐘，利用Vortex mixer 混合1分鐘後，放置360度旋轉混合器10分鐘後靜置，於30分鐘後加入phosphate buffer (PBS)至50ml的體積中和反應，將離心管置入溫控離心機中離心3100g，15 分鐘，離心完成後，將上清液倒入含消毒劑的廢液瓶內，留取沉澱物。

## (2)檢體接種培養

檢體於消化去汙染後以超高速離心後取沉澱物製作成抹片，將抹片進行抗酸性染色後先行觀察是否有抗酸菌以做為培養結果配合參考，沉澱物同時接種至MGIT試管進行培養。

抗酸菌的培養是將於離心管中完成消化去汙染的檢體加入約1 mlPBS後混合均勻，取0.5 ml 的沉澱物至已經加入PANTA的MGIT培養管內，於完成接種動作後二個小時內放至BACTEC MGITTM 960儀器中進行培養<sup>(41)</sup>，陰性培養週期為42天。

## 二、抗酸菌鑑定

本實驗中的抗酸菌鑑定是將MGIT管中培養呈現陽性結果檢體取出後進一步進行菌種鑑定，一般可利用為傳統生化鑑定方法<sup>(34)</sup>、分子生物學鑑定方法<sup>(35)(32)(33)</sup>及*M. tuberculosis*分泌性蛋白檢測法<sup>(24)(27)</sup>等三種。抗酸菌培養的結果若為陽性需以Acid fast stain確認其為真陽性(即有抗酸菌生長)，記錄在顯微鏡檢下所觀察到的型態後再進行菌種鑑定，基本上*M. tuberculosis*之鑑定要先確定*Mycobacterium*的生長速度，最佳生長溫度，以及色素形成之特性。傳統生化學鑑定方法需先將MGIT管中菌落次培養於L-J slant中，典型的*M. tuberculosis*為表面粗糙的淡黃色(buff)菌落，生長速率屬於為需超過七天才生長的

慢速生長菌，在暗視野環境中培養並不產生色素屬於非產色菌，於L-J slant培養基上菌落型態表現粗糙，淡黃臘狀，為鑑定上重要特徵，在抗酸性染色後的顯微鏡檢中為紅色菌體，呈現如繩索狀。

*M. tuberculosis* 生化試驗nitrate還原試驗為(+)，niacin試驗為(+) <sup>(32)</sup>，菌落外觀及顯微鏡下索狀型態，*M. tuberculosis*在L-J medium中培養生長後呈現粗糙、淡黃臘狀且菌落聚集的型態，將液體培養基MGIT中的菌落塗抹片後於電子顯微鏡下觀察則可發現*M. tuberculosis*如麻繩繩索般的型態。

#### (1) 生長速度試驗 <sup>(42)</sup>

分枝桿菌在固定培養基形成成熟的菌落，不需使用放大鏡，用肉眼即可辨識。分枝桿菌中緩慢生長菌群與快速生長菌群之區別鑑定是將試驗菌落分別接種於L-J 培養基於35°C或30°C，緩慢生長菌群需7天以上才能於培養基觀察到菌落，快速生長菌群則僅於7天以內即能於培養基上觀察到菌落。進行生長速率鑑定時，應以經適當稀釋足以長出菌落的接種液，接種於固體培養基作繼代培養，才能得到正確客觀的評估。

#### (2) 菌落型態 <sup>(42)</sup>

將分枝桿菌接種至7H11平板培養基上，經過5-14天後，依長出的菌落型態用100×顯微鏡檢查可以區辨菌落周圍是否有索狀樣，可

以大致區分屬於那一種分枝桿菌，以作為分枝桿菌鑑定之輔助，判讀內容分為粗糙，平滑，圓形，扁平，是否產色等。*M. tuberculosis* 於Lowenstein Jensen(L-J)斜面培養基上菌落型態表現粗糙，淡黃臘狀，為鑑定上重要特徵。純化後菌體接種於Middlebrook 7H11 培養基5~10天後，在低倍顯微鏡下觀察是鳥巢式、繩索狀的菌落。但25天後則為粗糙、臘狀、淡黃的外表。

### (3) 細菌體的型態<sup>(42)</sup>

將長出的分枝桿菌透過抗酸染色及1000×顯微鏡觀察，可以依菌體的型態做粗略的區分那一種分枝桿菌。細菌型態會呈現蛇索狀 (serpentine cording)、短桿狀、點狀、柵狀。

### (4) 分子生物學方法確認<sup>(45)</sup>

目前*M. tuberculosis*分子生物學鑑定最常使用的引子為IS6110片段，本片段為TB complex特有的片段，因此目前針對TB complex的分子生物學檢測幾乎都是以此片段做為引子首選<sup>(29)(35)(32)(33)</sup>。實驗中若發現有生化反應不典型時會輔以本方法進行確認。

DNA抽取步驟為：先依照一般抗酸菌檢體前處理程序進行去消化及去污染的動作，取出ProbeTec sample tube貼上標籤後置於鐵架上，將搖勻之buffer 1 懸空倒至空白玻璃真空採血管中，吸取1000 µl

之buffer 1，加至預先準備好的sample tube中，以vortex強力震盪  
(NALC-NaOH處理後之檢體沉渣5秒，打開裝檢體之離心管，以  
aerosol-resistant tip吸取500 µl之檢體（若檢體量不足可加入適量之  
PBS混合均勻後再吸取），加入準備好之sample tube中，將sample tube  
置於震盪器上混合5秒，將sample tube在生物安全操作台內放入  
aerosol containing rotor中，並旋上rotor的蓋子。將rotor放至超高速離  
心機中，12,200 X g 離心3分鐘，取出sample tubes，並避免離心管內  
之上清液與沉澱混合，打開管蓋，將上清液倒入廢液桶內，並以手  
指輕彈管子以倒除剩餘上清液。將sample tubes放至專用oven中，溫  
度115°C，60分鐘以殺死活菌。sample lysis：將超音波震盪水槽(BD  
ProbeTec<sup>ET</sup> sonic bath)預熱至65 +/- 5 °C，並確定水槽內的水位是否  
在MAX 和 MIN之間，取出oven中之sample tube，放入裝standard  
rotor 的離心機內，離心10秒鐘，加入CTB wash buffer 2 100 µl，旋  
緊Sample Tube蓋子，強力震盪每一檢體5秒鐘。離心管放回試管架上  
時，將管子依架上凹槽壓入，放進超音波震盪水槽60分鐘。sample  
neutralization：sample tube放入裝standard rotor 的離心機內，離心10  
秒鐘，吸取600 µl 的CTB lysis buffer 3到檢體離心管內。

sample priming：取出priming reagent cup放至加熱盤中，加入抽  
好DNA的檢體150 ml至priming reagent cup，加熱75°C，20分鐘，同

時將amplification reagent cup放至54°C加熱盤中預熱，20分鐘後將priming reagent cup中檢體抽取100 ml加至amplification cup中，以膠膜封蓋，即可放至BD ProbeTec™ ET儀器中進行分析。分析時間60分鐘，完成後儀器自動報告為陽性或陰性，陽性結果即表示檢體中含有*M. tuberculosis* complex DNA<sup>(45)</sup>。

### 三、*M. tuberculosis* 藥物感受性試驗

利用agar proportion method的方法為先將待測菌種與實驗室標準菌種經百倍稀釋成不同濃度再接再種於含藥培養基，所稀釋的接種液中需至少有一濃度能長出50-100個分離菌落，經由稀釋倍數及所長出菌落數的計算，即可算出於特定藥物濃度下抗藥性變異菌株所佔的比例<sup>(28)(29)</sup>。抗藥性定義為大於1%的細菌出現在抗結核菌的藥物臨界濃度中，則此藥物即不予繼續當作結核菌治療藥物。

#### **(1) agar proportion method操作streptomycin、isoniazid、rifampin、ethambutol四種抗生素及clofazimine單項抗生素**

藥物感受性操作方法為取自7H11已鑑定的*M. tuberculosis*，接種菌落必須新鮮，勿超過4~5星期老的菌落，且小心取勿刮到培養基，以接種環刮取培養基表面多處的菌落，置於有6~10顆玻璃珠之含蓋試管中研磨，調製成菌懸浮液，充份震盪1~2分鐘，勿生氣泡，

管子放置 30 分鐘讓大顆粒沉降，與減少可能產生的氣霧(aerosol)，上清液吸到另一支無菌管，調濃度到 McFarland 1 的標準值，取 0.5ml 的上清液到另一支 4.5ml 的無菌管，調至成  $10^{-2}$  濃度，7H10 每一格都接種 0.1mL (無菌滴管三滴的量) $10^{-2}$  濃度的菌液，接種後的 7H10 放室溫，直到接種菌液吸入瓊脂中，將 7H10 分別封入  $\text{CO}_2$  可通透的塑膠袋中，置於  $37^\circ\text{C}$ 、10%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養 21 天。

結果判定方法為：第一週先觀察 (7 天)判讀是否有污染的細菌、黴菌或任何快速生長的分枝桿菌。緩慢生長的分枝桿菌也可能在 2 星期的培養出現，於第三週判讀，即計數含有藥劑之 7H11 培養基上之菌落數除以不含藥劑之對照 7H11 培養基上之菌落數，以所得結果之百分比作為判定，若百分比小於 1% 表示有感受性 (susceptibility)；百分比大於 1%表示有抗藥性(resistant)，當不含藥劑之 7H11 培養基上之菌落數未滿 50 個菌落數時，須再次重新操作，最後判讀的時間在培養後 3 星期。若 control quadrant 在 3 星期沒有菌落生長，則分枝桿菌藥敏試驗重新操作，並且將原先的培養基再留置三週後觀察，始發出最終報告。

## (2)以 BACTEC MGITTM 960 儀器進行 pyrazinamide 藥敏試驗

pyrazinamide 這個藥物的藥物感受性試驗必須在弱酸性的環境下進行操作，因此與傳統的 agar proportion method 不同，故選擇以自

動化儀器進行操作。BACTEC MGIT 960 PZA培養基是含有調整過之Middlebrook 7H9 Broth的試管，可用來支持分枝桿菌的生長與偵測，且其pH值降低為5.9。BACTEC MGIT960 PZA培養基試管含有螢光化合物，被埋在16x100 mm圓底試管底部之矽膠內，螢光化合物對溶於培養液中氧氣的出現具敏感性，最初溶解氧氣的濃度會消弱化合物的放射，可被測的螢光很少，之後，活躍生長和呼吸的微生物會將氧氣消耗，使化合物可發出螢光。BACTEC MGIT 960 PZA套組是一個需時4 - 21天之定性試驗，此試驗是根據比較*M. tuberculosis*菌株在含藥試管及不含藥試管(生長對照，growth control)之生長情形。BACTEC MGIT 960 儀器持續監控試管內螢光的增加，儀器利用比較在含藥試管內螢光與生長對照試管內螢光之分析來判定耐受性的結果，BACTEC MGIT 960儀器會自動解釋結果，並報告其為敏感性或抗藥性結果。

#### 四、聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

本實驗所用的引子序列列於表一，聚合酶連鎖反應是以一種以酵素的方法來增殖DNA的技術，依據Saiki等人的方法，設計兩條分別與所要增殖的DNA雙股之一的起啟或末端序列互補的寡核苷酸引子(oligonucleotid primer)，再以要增殖的目標DNA做為模板(template)，再加上dNTP及適當的緩衝溶液混合，經過高溫變性

(denature)，降低溫度黏合(annealing)及DNA聚合酶(DNA polymerase)的延伸(extension)作用，將此段DNA複製出來，重覆此循環，而使目標DNA達到增殖的目的。取一支200  $\mu\text{l}$  PCR薄壁微量離心管，依序加入10x *Taq*緩衝液5  $\mu\text{l}$ ，2.5 mM dNTP混合液4  $\mu\text{l}$ ，引子(10 micromole/ $\mu\text{l}$ )各1  $\mu\text{l}$ 及模板(質體DNA需1 ng，染色體DNA，0.05~1.0  $\mu\text{g}$ )。隨後補適量之二次去離子水至體積為49  $\mu\text{l}$ ，短暫離心(spin down)使反應液集中至管底，再加入*Taq* DNA polymerase (2.5 U/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ ，將此微量離心管放入Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer)的反應槽內，PCR的反應條件為：94 $^{\circ}\text{C}$  1分鐘，使雙股DNA打開；62 $^{\circ}\text{C}$  1分鐘，使模板及引子鏈合；72 $^{\circ}\text{C}$  1分鐘，使DNA延伸，在此條件下重覆34循環後，再於72 $^{\circ}\text{C}$ 反應10分鐘，使DNA延伸完全。反應條件可依引子之結構和複製之DNA大小不同而改變，反應完成後，取5  $\mu\text{l}$ 進行洋菜膠電泳實驗。

## 五、DNA電泳

以0.5X TBE電泳緩衝液配製2%瓊脂膠體(agarose gel)。DNA與6X DNA loading dye混合均勻後加至膠體中，以50V或100V電流進行電泳後，將膠體至於1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ethidium bromide溶液染色15至20分鐘，再將膠體置於UV燈下觀察照相。

## 六、勝任細胞製備

質體 DNA 需既由轉形作用 (transformation) 的技術，送入勝任細胞 (competent cell) 藉由宿主成複製 DNA 及表現蛋白的目的。製備前一天，從 petri dish 上挑單一菌落，培養至 3ml LB broth 中，於 37°C 培養箱中 16~20 小時。取 500  $\mu$ l 培養菌液至 20ml LB broth，置於 37°C 培養箱震盪培養 3 小時至菌液的 OD<sub>600</sub> 值約為 0.6，漿菌液放置冰上 1 分鐘，以高速冷凍離心機 4°C、8000rpm，離心 5 分鐘，在無菌操作台內倒掉上清液，加入滅過菌且保存在 4°C 的 CaCl<sub>2</sub> (100mM) 15ml 均勻沖散，置於冰上 25 分鐘，偶爾可以搖晃，再以高速冷凍離心機 4°C、8000rpm，離心 5 分鐘，在無菌操作台內倒掉上清液，回溶 1ml CaCl<sub>2</sub> (100mM)，保存至 4°C、3-7 天備用。

## 七、質體抽取

挑單一菌落培養至 LB broth，12-16 小時後取 1.5ml 至微量離心管，離心條件為 12000rpm，5 分鐘，倒掉上清液。重複此步驟一次。加入 solution I 100  $\mu$ l，劇烈震盪至均勻混合，在室溫靜置 5 分鐘，加入 solution II 200  $\mu$ l，緩慢且均勻混合，需在冰上靜置 5 分鐘，加入 solution III 150  $\mu$ l，緩慢且均勻混合，需在冰上靜置 5 分鐘，離心，條件為 12000rpm，10 分鐘，取上清液至新的微量離心管，加入 phenol 和 chloroform 比例為 1:1，離心條件為 12000rpm，5 分鐘。重複此步

驟一次。再取上清液加入chloroform離心，條件為12000rpm，5分鐘。  
取上清液加入2-2.5X 體積之95% alcohol，劇烈震盪，並靜置在冰上  
10分鐘，離心條件為12000rpm，10分鐘。用75% alcohol約200  $\mu$ l  
rinse，離心條件為12000rpm，3分鐘。回溶加入20  $\mu$ l 滅菌過之二次  
水。。

#### 八、DNA黏接反應(Ligation)

在eppendorf中加入經過內切限制酶作用後的DNA，包含載體  
(vector) 與插入DNA (insert)，vector和insert的比例為1：7，並加  
入10X ligation buffer 2 $\mu$ l和T4 DNA ligase 1 $\mu$ l，反應總體積為20 $\mu$ l，並  
於16 $^{\circ}$ C反應16小時，使DNA互相黏合，再經由轉形作用送入勝任細  
胞。

#### 九、轉型作用 (Transformation)

取一無菌之1.5 ml微量離心管，加入勝任細胞100  $\mu$ l，質體DNA  
或DNA黏合混合液，混合均勻後置於冰中25分鐘，再將離心管取出  
置於42 $^{\circ}$ C水浴中120秒進行熱休克(heat shock)，然後立即置於冰液  
中，加入500  $\mu$ l LB broth，於37 $^{\circ}$ C恆溫培養箱震盪培養2小時，取出  
菌液150  $\mu$ l，以無菌玻棒均勻塗佈在含抗生素的LA培養基上，隨後  
置於37 $^{\circ}$ C恆溫培養箱中，培養12~16小時，等到菌落長出再後篩選

出帶有質體或構築正確之質體的轉形菌株(transformant)

## 十、快速篩檢 (Rapid screen)

做此實驗大量篩檢出想要的plasmid大小，節省時間，但還是必須經由限制酶確定其大小。需要挑單一菌落至LB broth培養12-16小時，取1.5ml菌液至微量離心管後離心，離心條件為12000rpm，5分鐘，倒掉上清液加入2X loading dye (內含1%SDS) 20  $\mu$ l，同時並加入phenol和chloroform比例為1：1，劇烈震盪1min後離心，離心條件為12000rpm，5分鐘，取 6 $\mu$ l上清液，以洋菜膠電泳進行確認。

## 十一、表現載體的構築

依照*M. tuberculosis*的基因序列，在基因ORF (open reading frame)的起始與終止之位置分別設計一條含有不同限制酶切位的引子(表一)，利用聚合酶連鎖反應，將目標基因由染色體上大量複製出來,經限制酶剪接後，選殖入pQE30 (Qiagen)表現載體上，再轉形入*E. coli* NovaBlue，以IPTG誘導基因大量表現。

## 十二、 Histidine-Tag affinity gel

取出適當的HIS-Select Nickel Affinity Gel加入層析管，用2倍體積的去離子水沖洗，之後加入3倍體積的平衡液 (equilibration buffer) 沖洗，移除大部分平衡液後備用。加入帶有target histidine的處理過

澄清檢體，流速2-10 column volumes/hour (操作不要超過6小時)，加完檢體後，加入wash buffer去除非專一性鍵結，流速10-20 column volumes/hour，使得沖出液的OD280接近wash buffer的吸光值。加入 elution buffer 3-10 column volumes，流速2-10 column volumes/hour，收集並分析此蛋白。

### 十三、 PZase activity

挑單一菌落培養至 LB broth，並加入抗生素 ampicillin (最後濃度 50 $\mu$ g/ml)和 PZA (最後濃度 8mM)，37 $^{\circ}$ C 培養 16~18 小時，離心條件為 12000rpm，4 $^{\circ}$ C，10 分鐘，去除上清液，並加入 assay buffer，劇烈震盪使沈澱物均勻散佈在溶液內，操作兩次，之後用 assay buffer 使菌液 OD<sub>600</sub> 值為 0.2~0.6。取出一部份做 Whole cell suspension 活性測定，另一部份做 Crude extract 活性測定。

#### (1) Whole cell suspension 活性測定

將取出之菌液加入 PZA(最後濃度 8mM)，分別於 0 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、60 分鐘及 120 分鐘後離心，離心條件為 12000rpm，室溫，3 分鐘，取其上清液，加入 0.05 倍體積的呈色劑 0.5M ferrous ammonium sulfate，測其 OD<sub>480</sub>，並記錄。

#### (2) Crude extract 活性測定

取出一定量菌液，破菌(sonicator)條件為3分鐘，sonication 10

秒，停止 10 秒，結束後，離心，條件為 12000rpm，4°C，2 分鐘。  
取出上清液 A，沈澱物加入等比例的 assay buffer，劇烈震盪使沈澱物均勻散佈在溶液內，以 12000rpm 再離心，2 分鐘後取出上清液 B，使 A 和 B 混合均勻後加入 PZA (最後濃度 8mM)，分別於 0 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、60 分鐘及 120 分鐘後，加入 0.05 倍體積的 0.5M ferrous ammonium sulfate 呈色劑，測其 OD<sub>480</sub>，並記錄

#### 十四、金屬離子 (Metal ion chelation)

挑單一菌落培養至 LB broth，並加入抗生素 ampicillin (最後濃度 50µg/ml) 和 PZA (最後濃度 8mM)，37°C 培養 16~18 小時，離心條件為 12000rpm，10 分鐘，去除上清液，並加入 assay buffer，劇烈震盪使沈澱物均勻散佈在溶液內，操作兩次，之後用 assay buffer 使菌液 OD<sub>600</sub> 值為 2.3~2.7。破菌 (sonicator) 條件為 5 分鐘，on 10 秒，off 10 秒。結束後，離心，條件為 12000rpm，4°C，10 分鐘。取上清液，加入 EDTA，最後濃度分別是 5mM、10mM，和一管未加入 EDTA 之溶液。在室溫搖晃 6 小時，再加入不同離子在 37°C 搖晃 30 分鐘，再加入 PZA 在 37°C 搖晃 30 分鐘，離心條件為 12000rpm、室溫、3 分鐘，取其上清液，再加入 0.05 倍體積的呈色劑 0.5M ferrous ammonium sulfate，測其 OD<sub>450</sub>，並記錄。

## 十五、疏水性群集分析 (Hydrophobic cluster analysis, HCA)

分析介於一級結構和三級結構之間，也就是二級結構。主要利用其胺基酸特性分析 (主要是疏水性胺基酸)其序列的二級結構。<sup>(26)</sup>

依照疏水性的胺基酸易聚集在一起形成折疊( $\alpha$ -helix、 $\beta$ -sheet)，分析 identity 低和辨別是否為同源蛋白的一件有力的工具。

從1D的胺基酸序列把容易形成  $\alpha$ -helix 或  $\beta$ -sheet 的疏水性 (hydrophobic) 胺基酸標成1，非疏水性(nonhydrophobic)胺基酸標成0。Q code 分解成四個基本單位：分別是V(vertacal, 11)、M(mosaic, 101)、U(up, 1001)、D(down, 10001)，Q code 可以幫助我們更了解此蛋白二級結構的特徵。其中還有四個胺基酸的符號代表：proline(★) 為疏水性蛋白，是唯一的二級胺基酸，其構造不易變動；glycine(◆) 最簡單的胺基酸，為非必需胺基酸，造成蛋白質結構有較大的彈性及結構空間；serine(□) 或 threonine(□) 這些兩個小的極性胺基酸在 helix 中可以透過在主鏈上羰基(carbonyl)的氫鍵(H-bonding)遮蔽他們的極性。

從附錄三，經由2D HCA diagram 得到2D結構，(a)序列用圓柱表現  $\alpha$ -helix。(b)圓柱依軸平行切開，攤開成二維的圖形。(c)緊實而且 duplicate，為了呈現  $\alpha$ -helix 的每一個胺基酸。(d)把非隨機分佈而且有傾向形成 cluster 的疏水性胺基酸(hydrophobic amino acid)上色、圈

選。(2D-d)深綠色、垂直的cluster為 $\beta$ -sheet，深黃色或橘色、水平的cluster為 $\alpha$ -helix，並對應至旁邊有圖解的3D結構圖個別的颜色。<sup>(26)</sup>



### 第三章 研究結果

本實驗檢體來源為選取之前研究已確認為 MDR- TB 的菌株，利用 MGIT method 對 MDR-TB 作 PZA 的抗性試驗，PZA 的標準濃度為 25-50  $\mu$ g/ml，判斷其是否產生抗性，發現 56 株 MDR-TB 菌株，有 37 株 MDR-TB 菌株對 PZA 產生抗性 (62.82%)，分析 PZA 有抗藥性的 Multidrug-resistant TB 中 *pncA* gene 產生突變佔 69.7% (23/33)。

利用資料庫 ExPASy 比對 *M. tuberculosis* 的 *pncA* 基因序列差異性，挑出有差異的序列，在基因 ORF (open reading frame) 的起始與終止之位置分別設計一條含有不同限制酶切位的引子，利用聚合酶連鎖反應，將目標基因 561 個核苷酸由染色體上大量複製出來，經限制酶剪接後，選殖入 pQE30 (Qiagen) 表現載體上，參照圖六，再轉形入 *E. coli* NovaBlue，以 IPTG 誘導基因大量表現其蛋白並測活性，結果如下。

圖七為依照 *M. tuberculosis* 的 *pncA* 基因序列，引子為 *pncA1* 及 *pncA2*；圖八為挑得菌株後，抽取質體，利用限制酶切割後之電泳圖。

#### 第一節 PncA 蛋白的純化及分子量

加入 1mM isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) 或 PZA 最終濃度 8mM 誘導 24 小時表現其蛋白。PncA 蛋白為一胞內酵素，會表現在 *E. coli* novablue/pQE30-*pncA* 的細胞質內，預估分子量約為 23kDa，經由破菌及經由鎳親和性層析法 (nickel affinity chromatography) 純化蛋白，純化

過後的蛋白利用SDS-PAGE觀察分子量大小。發現有single band且分子量位於20-25 kDa之間，如圖九，與推測分子量相符。

## 第二節 分析定序結果

依據 MGIT method 發現在 MDR-TB 中對 PZA 產生抗性的有 62.82%，但在 PZA 產生抗性的 MDR-TB 中 *pncA* 基因產生突變的比例 69.70%。取突變的 *pncA* 基因和標準菌株 *M. tuberculosis* H37Rv 做比對，如圖十，核苷酸和胺基酸的突變的位置和突變成何種核苷酸或胺基酸。再依照突變後的胺基酸位置，做成圖十一的分佈圖。發現有幾株的突變點相同，突變在第37個胺基酸有4株；突變在第76個胺基酸有3株；突變在第140個胺基酸有3株。大部分突變點分散，以胺基酸區域區分，集中於1-8、57-83、139-155。

## 第三節 PncA 蛋白活性

把有突變的 *pncA* 基因和從標準菌株的 *pncA* 基因送至 *E. coli* novablue 表現 PncA 蛋白去測其蛋白是否具有活性，依照反應時間和產物濃度的關係如圖十三，因為上清液有經過稍微稀釋和碰撞頻率的關係，所以一般而言會偏低。由圖可見3種 PncA 蛋白活性：(1) PncA 蛋白活性不變；(2) PncA 蛋白活性降低；(3) PncA 蛋白沒有活性。利用活性標準曲線(圖十二)換算成濃度列於表四。

發現胺基酸變異成V7F、Y34形成終止碼、E37G、H57D、K96Q、V139A、V155G，PncA蛋白則會完全喪失活性；胺基酸變異成L4W、D8E、C72R、R140C、D166H、T167A，PncA蛋白所測之活性會下降；胺基酸突變S32R則不影響其活性。

若只變異在胺基酸第 37 的位置會影響活性，再加上另一點變異(胺基酸第 140 位置)所測得之活性會有些許上升。但是當變異點除上述兩點外再加上另外 2 個點突變(胺基酸第 72 和第 159 位置)所測之活性還會再降低。所以胺基酸第 37 的位置 glutamic acid 變異成 glycine 會降低活性，胺基酸第 140 位置 arginine 變異成 cysteine 會提高些許活性。也發現在同一位置變異成不同胺基酸時，蛋白活性會跟著不同，如在胺基酸第 76 位置突變成不同之胺基酸，所測得活性也會不同。把在原本在第 76 位置的 threonine 換成 isoleucine 會比置換成 proline 的活性來的高，推測是因為蛋白性質的改變所造成活性差異。在胺基酸第 32 位置 serine 變異成 arginine 則不影響其 PncA 蛋白活性。

由表四發現，突變點太過分散，而且不論是在  $\alpha$ -helix 或  $\beta$ -sheet 上任意一點或者其他胺基酸位置只要發生突變，則其產生的蛋白大部分活性都會降低。基因突變是影響 PZA 抗性的重要因素。在不同的胺基酸位置突變會影響其蛋白活性；在同一位置突變成不同胺基酸也會影響其活性。

#### 第四節 金屬離子的影響

圖十四(A)加入不同濃度的 EDTA 會影響其蛋白活性。而且加入的 EDTA 濃度越高，則所測得之 PncA 蛋白的活性會越低，加入 10mM EDTA 所測得之活性比 5mM EDTA 低，又比沒加入 EDTA 的 PncA 蛋白所測值低。圖十四(B)把已加入 EDTA 的檢體再加入適量的不同金屬離子(錳離子、鎂離子、鈣離子、鋅離子、鐵離子、鈷離子、銅離子)，發現有些金屬離子可以回復其蛋白活性，不同的金屬離子所回復的活性也有所不同。發現加入鋅離子( $Zn^{2+}$ )、鈷離子( $Co^{2+}$ )、銅離子( $Cu^{2+}$ )皆無法回復活性，甚至還會使活性下降，加入鎂離子( $Mg^{2+}$ )、鈣離子( $Ca^{2+}$ )則會接近加入 EDTA 但是沒加入任何金屬離子所測得之值。如果加入的是鐵離子( $Fe^{2+}$ )則會比未加金屬離子的值高。

依 bioinformation 預測此蛋白有一 metal binding site，所以此蛋白會被 EDTA 所影響，也會被不同的金屬離子所影響，證實此 PncA 蛋白需要金屬離子與之作用才可以具有較好的活性。

#### 第五節 Sequence alignment

利用 msa.cgb.ki.se 資料庫比對(圖十五)皆為同一 sperfamily 所得之 conserved sequence，雖然不同菌序列的差異大，但有 conserved amino acid 24個。配合 HCA method，可以從已知 *Pyrococcus horikoshii* 的結構

重要的活性位C133推得*M. tuberculosis*的位置為C138。以此類推可得 catalytic site (胺基酸第8、96、138位置)、metal-binding site (胺基酸第49、51、71位置)和 cis-peptide bond (胺基酸第133、134位置)。

## 第六節 疏水性群集分析 (Hydrophobic cluster analysis, HCA)

屬 amidohydrolase，發現此兩種蛋白胺基酸序列相同度有 37%。想瞭解並分析二級結構是否相同所以採用 HCA method (hydrophobic cluster analysis)，此方法可以偵測保守的二級結構組成(conserved secondary-structure elements)，尤其是在序列結構具有低相同度。

由圖十六 *Pyrococcus horikoshii* 的 PZase 蛋白有 11 個 hydrophobic cluster，6 個  $\beta$ -strands 和 5 個  $\alpha$ -helices。藉由 HCA method 觀察此蛋白的 hydrophobic cluster 發現  $\beta$ -strands 和  $\alpha$ -helices 交替出現。*Pyrococcus horikoshii* 的 hydrophobic cluster 表示為 Leu-Ile-Val-Val( $\beta$  1)、Val-Ile-Phe( $\alpha$  1)、Leu-Ile-Val( $\beta$  2)、Phe-Val-Leu( $\alpha$  2)、Val-Ile-Ile( $\beta$  3)、Leu-Ile-Leu( $\alpha$  3)、Val-Tyr( $\beta$  4)、Val-Ala-Leu( $\alpha$  4)、Val-Tyr-Leu( $\beta$  5)、Leu-Met( $\alpha$  5)、Ile-Val( $\beta$  6)；*M. tuberculosis* PncA protein 表示為 Leu-Ile-Ile-Val( $\beta$  1)、Leu-Ile-Tyr( $\alpha$  1)、Val-Val-Ala( $\beta$  2)、Phe-His-Leu( $\alpha$  2)、Val-Phe-Tyr( $\beta$  3)、Leu-Trp-Leu( $\alpha$  3)、Val-Val( $\beta$  4)、Val-Ala-Val( $\alpha$  4)、Val-Leu-Val( $\beta$  5)、Leu-Met( $\alpha$  5)、Leu-Val( $\beta$  6)。

值得被注意此蛋白大部分的 conserved hydrophobic amino acid 都具有一致性。發現在 *Pyrococcus horikoshii* 上的重要蛋白（如：catalytic protein 或 metal-binding protein）位置靠近 hydrophobic cluster 上的  $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\alpha 4$ 。而在 PncA 具有高度保留性的 hydrophobic cluster 也是如此，在假設的二級結構  $\beta 1$ (Asp8)、 $\beta 2$ (Asp49 和 His51)、 $\beta 3$ (Lys96)、 $\beta 4$ (Ala134 和 Ile133)、 $\alpha 4$ (Cys138)。

PncA 蛋白和 PZase 蛋白利用 hydrophobic cluster、演化保留殘基 (conserved residue) 和序列比對 (sequence alignment) 藉由同源的三級結構模型所建造出 PncA 蛋白結構。PncA 蛋白結構的折疊會和 PZase 的結構一致。

## 第七節 模擬結構圖分析

*M. tuberculosis* 的 PncA 蛋白是由已知 *Pyrococcus horikoshii* 的同源結構 PZase 蛋白為基礎，經由生物資訊的資料庫所構築出 3D 結構圖，圖十七(A)。

如圖十七，利用 Swiss-model，分別去模擬 wide-type 的 PncA 蛋白 (*M. tuberculosis* H37Rv)，結構，PncA 蛋白突變 E37G，PncA 蛋白突變 E37G 和 R140C，和 PncA 蛋白突變 E37G、C72R、R140C 和 L159P 的四個模擬蛋白。第 37 個胺基酸剛好位於第一個  $\alpha$ -helix，對照 wide-type 的 PncA 蛋白，發現除了第一個  $\alpha$ -helix 多一個 turn 之外，在結構圖的左側，也就

是靠近金屬結合位(metal-binding site)的附近結構變得鬆散，圖十七(B)。圖十七(C)，突變E37G和R140C兩個胺基酸，結構圖雖然看起來和(B)比較無太大的差異，但是懷疑PncA蛋白為小分子量，所以任何的突變，雖然結構圖無明顯差異，但是蛋白的一些性質已經改變，所以造成活性有些許的差異。圖十七(D)，突變四個胺基酸分別為E37G、C72R、R140C和L159P，因突變的胺基酸太多，所以造成結構具有重大的改變，除了先前提到的第一個 $\alpha$ -helix多一個turn和金屬結合位的附近結構變得鬆散之外，第四個 $\alpha$ -helix消失，所以造成此蛋白所測得之活性最低。由圖十六可知，突變E37G會造成活性下降。但是同時突變E37G和R140C活性比一個突變點E37G高，推測突變在第140個胺基酸的位置上有些許回復活性的能力。但是當突變點太多，對於結構有重大缺陷時，則會完全喪失活性。

如圖十八，分別模擬wide-type的PncA蛋白，突變成T76P及T76I的PncA蛋白，雖然突變不在任何一個 $\alpha$ -helix或 $\beta$ -sheet上，但是不管是胺基酸第76個位置突變成脯胺酸(Proline)或異白胺酸(Isoleucine)，都會造成第一個 $\alpha$ -helix多一個turn和金屬結合位的附近結構變得鬆散，但是突變成不同胺基酸，在模擬結構上並無明顯差異，但是實驗所測得之活性有差異。可以推論因PncA蛋白為小分子量，雖然結構圖無明顯差異，但是突變成不同的胺基酸，所以造成PncA蛋白的一些特性改變，

所以測到之活性有差異。由圖十八可知，在同一位置突變成不同蛋白，所測知活性也會有些許不同

由圖十七、十八可知，除了突變點的位置會影響活性外，在同一位置上突變成不同的胺基酸，所測得之活性也會有所差異。



## 第四章 討論

在許多國家結核病的控制和抗藥性結核菌的全球監控是個重要的課題。抗藥性的產生使的治療結核更複雜，而且時常導致錯誤的治療。此外 MDR-TB 引發高罹病率及死亡率，特別是免疫不足的人。所以治療抗藥性和多重抗藥性的結核病人要付出高成本而且也有許多衍伸問題。因此如何在如何偵測、治療、防止抗藥性產生的策略就顯得非常重要。

本實驗檢體來源為已確認為 Multidrug-resistant TB 的菌株，利用 MGIT method 對 MDR-TB 作 PZA 的抗性試驗，PZA 的標準濃度為 25-50  $\mu$ g/mL，發現 56 株 MDR 菌株，有 37 隻菌株對 PZA 產生抗性 (66.1%)，分析 PZA 有抗性的 Multidrug-resistant TB 中 *pncA* 基因產生突變佔 69.7% (23/33)。和其他地區及文獻的比較稍稍偏低，因文獻提到 PZA 產生抗藥性，*pncA* 基因突變比例為 70%到 97%<sup>(22)</sup>。

在文獻得知都是用統計學的方法做統計，並不是知道蛋白是否有活性還是其他的因素。剩下的菌株 PZA-resistance 但 *pncA* 基因沒有突變的，有可能發生其他突變，如：promoter、DNA-binding site 或其他分子發生突變以致於產生 PZA 的抗性。由表三，和其他文獻比較 PZA 的抗藥性或 *pncA* 基因突變率有偏低的情形。可能的原因為在台灣治療結核病比較少用 PZA，因為其副作用比其他一線用藥來的大。

由其他文獻<sup>(3)(15)(23)</sup>中以統計學的觀點所發現的突變區域集中 5 -

12、69 - 85 及 132 - 142 或 3-17、61-76 及 132-142，從本實驗中分析突變區域集中 1 - 8、57 - 83 和 139 - 155，突變區域差異不大。

由生物資訊比對同家族的蛋白發現一些保守的區域(active site、metal binding site、cis-peptide)，推斷這些區域扮演相當重要的角色。從 CSHase 的生化或結晶發現 active site 的 cysteine 被暗示扮演相當重要的角色。依據此蛋白可被 EDTA 所影響，證明此蛋白需要金屬離子，之後又加入不同的金屬離子，想確定所需之金屬離子為何種，但是無法確定。所以可能從其他實驗去確認其金屬離子種類，而且無法利用金屬離子的實驗找出其金屬結合位，因本來無活性之突變蛋白經過此實驗後，並不會因不同金屬離子而會回復活性。所以只能利用同一個家族且蛋白結構相似的蛋白經由序列比對可以推測得知金屬結合位的蛋白。

而且 PZA 和其衍生物具有不太相同的特性。從 PZA 的衍生物 Morphazinamide (MZA)和 PZA 對 *M. tuberculosis* 具有相同的 MIC 8-16  $\mu$  g/ml。MZA 在細菌內會被分解成 PZA、formaldehyde 和 morpholine。和 PZA 不一樣的是，MZA 在中性或酸性環境都具有其殺菌功能，而且 MZA 可以殺死 non-tuberculosis mycobacteria (MIC=32  $\mu$  g/ml)和其他的細菌 (*Pseudomonas*、*Proteus vulgaris*、*Staphylococcus*)。PZA 的合成類似物 5-choloro-pyrazinamide (5-Cl-PZA)可能作用於 fatty acid synthetase I (FAS-I)所以和 PZA 作用機制不同。*M. tuberculosis* 沒有 PncA protein 活性

所以對 PZA 產生抗性但是 5-Cl-PZA 對此菌株還是具有殺菌功能。指出 5-Cl-PZA 的作用和 PncA proten 活性是獨立的。另一個不同點是 PZA 對 *M. smegmatis* 的 MIC 大於 2000  $\mu$ g/ml; 5-Cl-PZA 對 *M. smegmatis* 的 MIC 約為 32  $\mu$ g/ml，是否可以以 nicotinamide 或 PZA 為基礎，合成新的衍生物，使此衍生物更容易進到細菌體內，具有更良好的殺菌能力。或是研究其現有的衍生物或類似物機轉，進而去推論 PZA 的作用機轉，



## 第五章 結論與建議

### 第一節 結論

結核病是古老的疾病但卻也是到目前為止一直都難以根絕的疾病，這除了人與人間因交通的便捷而使接觸頻繁及增加接觸的機會而造成傳播的機率變大外，患者本身未配合用藥而使結核菌本身產生抗藥性而更加難以治療，除了MDR-TB外甚至有二線用藥產生抗藥性後而來的XDR-TB菌株的出現，這意味著這古老的疾病將是我們更需要多加防治的對象。

而且因為抗藥性比統計的偏低所以在台灣可以使用此藥物會有較好的療效，尤其搭配其他的一線藥物可以使得治療結核病的療程由9至12月縮短成6個月，而且此蛋白不論在哪一點產生突變，幾乎都會影響其活性而且即使突變在同一位置但是突變成不同的胺基酸，活性也會有所不同。利用蛋白比對和HCA method推測出催化位、金屬結合位和cis-peptide bond和NCBI所得之一致。此蛋白活性會受到EDTA及不同的二價金屬離子所影響。

依結構圖，可以得知雖然有些圖的結構無明顯差異但是所測得知活性還是會有差異。合理推測因此蛋白分子量小所以只要突變一個胺基酸就會造成某些蛋白特性的改變以至於影響其活性。

## 第二節 建議

因為此蛋白可以從基因層級去判斷其抗藥性，因為此基因只要發生突變就有很大的可能產生其抗藥性。因為通常核苷酸改變，胺基酸也會跟著改變，而且此蛋白當基因改變時，很高的比例會影響其活性。

既然此藥物作用機轉不明，是否可以從研究PZA的衍生物或類似物的機轉，然後回推至PZA的機轉。



## 第六章 參考文獻

1. Florian Diwischek. Development of synthesis pathways and characterization of cerulenin analogues as inhibitors of the fatty acid biosynthesis of *Mycobacterium tuberculosis* and of efflux pump resistant *Candida albicans*. Würzburg 2008
2. World Health Organization. WHO report 2008. Global Tuberculosis Control 2008;1-35
3. Y. Zhang, D. Mitchison. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003 ; 7:6–21
4. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *M. tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-544
5. Dalmer O, Walter E. Verfahren zur Herstellung von Derivaten der Pyrazinmonocarbonsäure. *DRP* 1936; 623: 257
6. Felder E, Pitre D. Pyrazinamide. *Analytical Profile Drug Substances* 1983; 12: 434–462.
7. Pyrazinamide. *Tuberculosis* 2008; 88(2): 141 – 144
8. Heifets L & Lindholm-Levy P (1992) Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semi-dormant *Mycobacterium tuberculosis*

- bacterial populations. *Am Rev Respir Dis* 145, 1223 – 1225.
9. Mitchison DA (1985) The action of antituberculosis drugs in short course chemotherapy. *Tubercle* 66, 219 – 225.
  10. Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, de Lange WC, van der Ven AJ, Dekhuijzen R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Feb;23(2):192-202.
  11. Du X, Wang W, Kim R, Yakota H, Nguyen H, Kim SH. Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry* 2001;40:14116-1417
  12. Zhang H, Deng JY, Bi LJ, Zhou YF, Zhang ZP, Zhang CG, Zhang Y, Zhang XE. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* nicotinamidase/pyrazinamidase. *FEBS J.* 2008 Feb;275(4):753-62.
  13. Mphahlele M, Syre H, Valvatne H, Stavrum R, Mannsåker T, Muthivhi T, Weyer K, Fourie PB, Grewal HM. Pyrazinamide resistance among South African multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 2008;46:3459–3464
  14. Portugal I, Barreiro L, Moniz-Pereira J, Brum L. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:2736–2738
  15. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, Zhang Y. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997;4:540–543

16. Clemente WT, Soares Lima SS, Palaci M, Silva MS, Sumnienski Rodrigues VF, Dalla Costa ER, Possuelo L, Cafrune PI, Ribeiro FK, Gomes HM, Serufo JC. Phenotypic and genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2008;62:199–204
17. Morlock GP, Crawford JT, Butler WR, Brim SE, Sikes D, Mazurek GH, Woodley CL, Cooksey RC. Phenotypic Characterization of *pncA* Mutants of *mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;44:2291–2295
18. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth BN, Musser JM. Mutations Associated with Pyrazinamide Resistance in *pncA* of *mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997;41:636–640
19. Gu P, Constantino L, Zhang Y. Enhancement of the antituberculosis activity of weak acids by inhibitors of energy metabolism but not by anaerobiosis suggests that weak acids act differently from the front-line tuberculosis drug pyrazinamide. *Journal of Medical Microbiology* 2008;57:1129–1134
20. Schaller A, Guo M, Gisanrin O, Zhang Y. *Escherichia coli* genes involved in resistance to pyrazinoic acid, the active component of the tuberculosis drug pyrazinamide. *FEMS* 2002;211:265–270
21. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* 2001;2:164–168
22. Singh P, Mishra AK, Malonia SK, Chauhan DS, Sharma VD, Venkatesan K, Katoch VM. The paradox of pyrazinamide: an update

- on the molecular mechanisms of pyrazinamide resistance in Mycobacteria. J. Commun. Dis. 2006 Mar;38:288-298
23. Lemaitre N, Sougakoff W, Truffot-Pernot C, Jarlier V. Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1761–1763
24. Kazue Hirano, Akio Aono, Mitsuyoshi Takahashi, and Chiyoji Abe. Mutations Including IS6110 Insertion in the Gene Encoding the MPB64 Protein of Capilia TB-Negative *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *JCM* 2004;42:390-392
25. Washington Winn, Stephen Allen, Willam Janda, Elmer Koneman, Gary Procop, Paul Schreckenberger, Gail Woods. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins 2005;6:1065-1124
26. Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, Chomilier J, Henrissat B, Mornon JP. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci*. 1997 Aug;53(8):621-45
27. Hill PC, Jackson-Sillah D, Fox A, Franken KL, Lugos MD, Jeffries DJ, Donkor SA, Hammond AS, Adegbola RA, Ottenhoff TH, Klein MR, Brookes RH. ESAT-6/CFP-10 Fusion Protein and Peptides for Optimal Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection by Ex Vivo Enzyme-Linked Immunospot Assay in The Gambia. *JCM* 2005;43:2070-2074.
28. Henry D. Isenberg, Phyllis Della-Latta. *Clinical Microbiology*

- Procedures Handbook. ASM Press 2006;2:7.1-7.7
29. Washington Winn, Stephen Allen, Willam Janda, Elmer Koneman, Gary Procop, Paul Schreckenberger, Gail Woods. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins 2005;6:1065-1124.
  30. Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for Recovery of *Mycobacteria* from Clinical Specimens Multicenter Study. JCM 1999;37:3578-3582.
  31. Becton,Dickson and Company : Mycobacteria Growth Indicator Tube 7 ml and Supplement with BACTEC™ MGIT™ Growth Supplement,BBL™ MGIT™ PANTA™ Antibiotic Mixture. BD BBL™ MGIT™ 2005;1-5
  32. Mazzarelli G, Rindi L, Piccoli P, Scarparo C, Garzelli C, Tortoli E. Evaluation of the BDProbeTec ET System for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pulmonary and Extrapulmonary Samples: a Multicenter Study. JCM 2003;41:1779-1782.
  33. John S. Bergamann,William E. Keating,And Gaill. Woods. Clinical Evaluation of the BDProbeTec ET System for Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. JCM 2000;38:863-865
  34. Partick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Lousie Landry, Michael A. Pfaller.Manual of Clinical Microbiology:2006, 8:535-536
  35. Neimark H, Ali Baig M, Carleton S. Direct identification and typing of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR. JCM 1996;34:2454-2459.
  36. Canetti, G., N. Rist, and J. Grosset. 1963. Mesure de la sensibilité' du

- bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la me'thode des proportions: me'thodologie, crite`res de re'sistance, re'sultats, interpre'tation. *Rev. Tuberc.* 27:217– 272.
37. Louw GE, Warren RM, Donald PR, Murray MB, Bosman M, Van Helden PD, Young DB, Victor TC. Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. *Int J Tuberc lung Dis.* 2006 Jul;10(7):802-7.
38. Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Mar;44(3):528-32.
39. Marttila HJ, Marjamäki M, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, Vasilyef AV, Viljanen MK. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jul;43(7):1764-6.
40. Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, Abe C. Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis.* 1997;78(2):117-22.
41. 呂振富.吳崑銘.詹淑芬.翁本才:分枝桿菌培養標準作業程序。芮弗士醫事檢驗所 2007;1-25
42. 陸坤泰.林碧芬.吳竹蘭.彭建芳.薛博仁.蔡文城.鄧麗珍.蘇維鈞:結核菌檢驗手冊。行政院衛生署疾病管制局 2004;1-106.
43. 台灣疾病管制局:結核病個案通報。2007 台灣結核病防治年報

2008;1-15

44. 陸坤泰.索任.劉永慶.李仁智.蘇維鈞.江義新.李秉穎.江振源.林錫勳.詹珮君: 結核病診治指引。結核病診治指引第二版 2006;1-90
45. 呂振富.吳崑銘.翁本才: 自動螢光分子生物鑑定系統 ProbeTec ET 操作手冊。芮弗士醫事檢驗所 2006;1-15
46. 台灣疾病管制局:結核病十年減半全民動員計畫。衛生署 95 年度防疫計畫;1-35



## 附錄一 結核藥物分類

Grouping	Drugs
<b>Group 1</b> 1st line oral antiTB agents	Isoniazid (H); Rifampicin (R); Ethambutol (E); Pyrazinamide (Z)
<b>Group 2</b> injectable antiTB agents	Streptomycin (S); Kanamycin (Km); Amikacin (Am); Capreomycin (Cm); Viomycin (Vi)
<b>Group 3</b> Fluoroquinolones	Ciprofloxacin (Cfx); Levofloxacin (Lfx); Moxifloxacin (Mfx); Ofloxacin (Ofx)
<b>Group 4</b> oral bacteriostatic 2nd line antiTB agents	Prothionamide (Pto); Ethionamide (Eto); Cycloserine (Cs); Terizidone (Trd); P-aminosalicylic (PAS); Thioacetazone (Th)
<b>Group 5</b> antiTB agents with unclear efficacy	Clofazimine (Cfz); Augmentin/Clavulanate (Amx/Clv); Clarithromycin (Clr); Linezolid (Lzd)

**附錄二、 Reported frequency of mutations in *pncA* gene  
from different geographical areas**

Study	Geographical area	Mutations in <i>pncA</i>
Sreevatsan et al <sup>19</sup>	USA	48 / 67=72%
Scorpio et al <sup>20</sup>	USA	33 / 38=87%
Hirano et al <sup>21</sup>	Japan	32 / 33=97%
Martilla et	Russia	31 / 36=86%
Mestdagh et al <sup>25</sup>	USA	16 / 23=70%
Lemaitre et al <sup>27</sup>	France	16 / 19=84%
Cheng et al <sup>28</sup>	Canada	53 / 57=93%
Hou et al <sup>29</sup>	China	32 / 35=91.4%
Bishop et al <sup>30</sup>	South Africa	10 / 15=67%
Huang et al <sup>31</sup>	Taiwan	7 / 17=41.2%
Miyagi et al <sup>32</sup>	Japan	20 / 26=77%
Tracerska et al <sup>33</sup>	Latvia	23 / 28=82%
Portugal et al <sup>34</sup>	Portugal	23 / 28=82%
Rodrigues et al <sup>35</sup>	Brazil	29 / 40=72%

### 附錄三 Hydrophobic cluster analysis

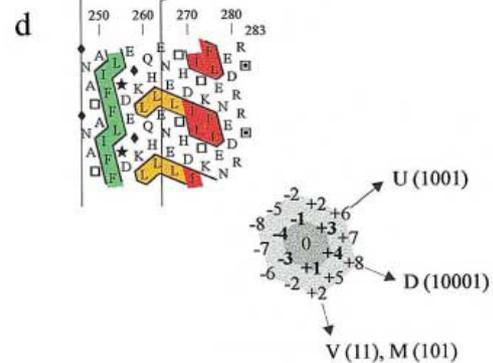
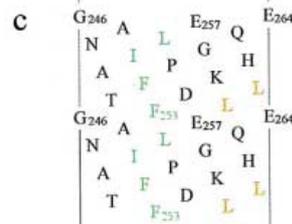
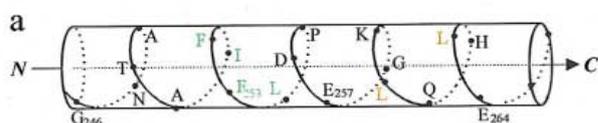
human  $\alpha 1$  antitrypsin

1D

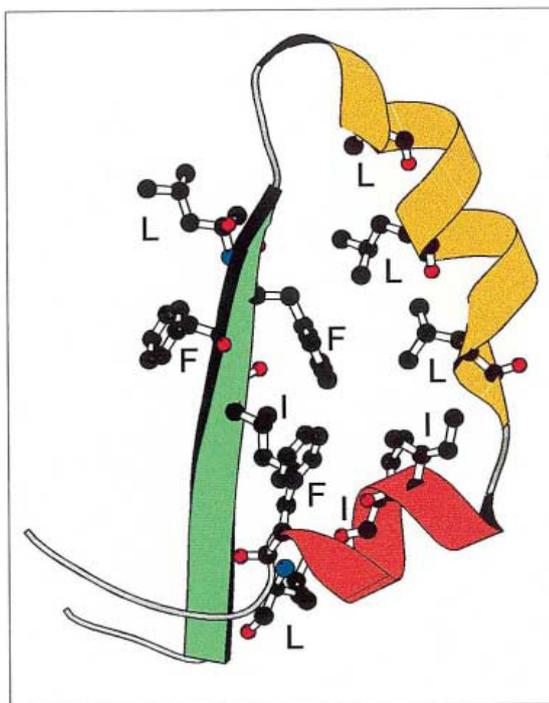
```

246 ...GNATAIFFFLPDEGKIQHLENELTHDIIITKFLNEDRRS... 283
...♦NA□AIFFL★DEGKIQHLENEL□HDII□KFLNEDRR□...
...000001111100000100100010001100110000000...
  
```

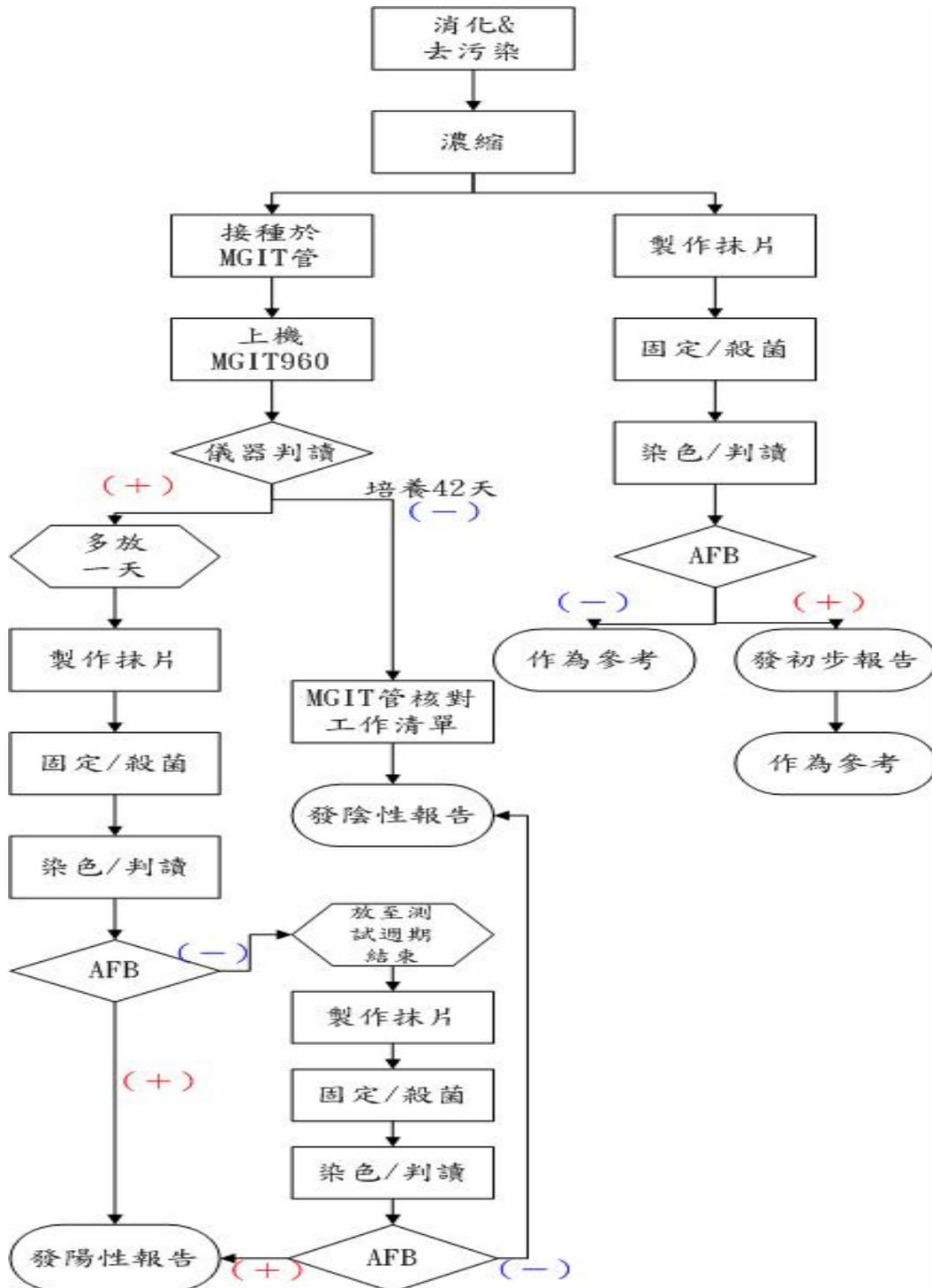
2D



3D



## 附錄四 實驗中抗酸菌培養作業流程



利用 MGIT 960 儀器進行培養，陰性培養時間為 42 天。

表 一、實驗中所使用基因位點名稱及序列

Locus name	primer
pncA1	GCTGGTCATGTTTCGCGATCG
pncA2	GCTTTGCGGCGAGCGCTCCA
pncBAF	CGGGATCCATGCGGGCGTTGATCATCGT
pncHAR	CCCAAGCTTCAGTTCATCCCGGTTTCGGCG



表 二、在MDR-TB中PZA產生抗藥性之比例和其他文獻之比較

Isolate of MDR-TB	PZA resistance	%	
68	62	91.18%	Reference 37
71	37	52.11%	Reference 13
78	49	62.82%	This study



表 三、pncA gene 突變所占比例和其他文獻之比較

PZA resistance		%	
total	<i>pncA</i> gene mutation		
57	53	92.98%	Reference 38
19	16	84.21%	Reference 23
36	31	86.11%	Reference 39
67	48	71.64%	Reference 18
33	32	96.97%	Reference 40
33	23	69.70%	This study



表 四、Pzase activities of wild-type and PncA mutant proteins

No. of isolates	Change(s) in:		Enzyme activity (uM/min*OD600) <sup>c</sup>	
	Nucleotide sequence <sup>a</sup>	Amino acid <sup>b</sup>	PZAase in whole cell	PZAase in extract
47R	A→C at position 1 C→T at position 4 7 insert	M1→L R2→W Frameshift	8.25 ± 0.71	8.76 ± 1.12
28R	T→G at position 11	L4→W	29.33 ± 0.96	21.46 ± 3.46
35R	G→T at position 19	V7→F	6.31 ± 1.13	12.46 ± 4.62
44R	C→G at position 102	Y34→Ter	4.50 ± 1.24	2.88 ± 0.71
83R	A→G at position 110	E37→G	15.11 ± 3.18	1.95 ± 0.54
36R	A→G at position 110 C→T at position 418	E37→G R140→C	29.74 ± 1.92	16.08 ± 2.74
82R	A→G at position 110 C→T at position 418	E37→G R140→C	39.66 ± 3.65	31.73 ± 3.41
78R	A→G at position 110 T→C at position 214 C→T at position 418 T→C at position 476	E37→G C72→R R140→C L159→P	6.15 ± 2.93	9.40 ± 1.08
15R	160 insert	Frameshift	4.98 ± 2.29	6.11 ± 2.71
46R	C→G at position 169	H57→D	1.90 ± 0.98	3.05 ± 1.23
55R	T→C at position 214	C72→R	22.39 ± 5.05	8.06 ± 1.17
6R	A→C at position 226	T76→P	4.70 ± 1.82	5.21 ± 1.94
49R	A→C at position 226	T76→P	5.54 ± 1.96	3.41 ± 2.02
48R	C→T at position 227	T76→I	11.51 ± 0.86	4.81 ± 2.54
19R	A→C at position 286	K96→Q	4.78 ± 2.15	12.42 ± 1.91
17R	T→C at position 416	V139→A	5.09 ± 2.03	4.32 ± 2.06
1R	C→T at position 442	R148→C		
43R	T→C at position 252	no change	52.94 ± 5.52	37.13 ± 3.87
32R	T→G at position 464 553 insert	V155→G Frameshift	3.08 ± 0.21	12.06 ± 0.84
34R	T→G at position 464 553 insert	V155→G Frameshift	4.86 ± 2.08	8.70 ± 3.39
5R	G→T at position 489	no change	4.34 ± 1.94	7.57 ± 1.38
4R	G→C at position 496 A→G at position 499	D166→H T167→A	24.56 ± 3.01	12.40 ± 2.83
80R	A→C at position 561	stop187Cys	3.69 ± 1.57	12.96 ± 1.59
98s	C→A at position 24	D8→E	33.81 ± 9.60	33.77 ± 9.19
62S	A→C at position 226 G→A at position 489	T76→P no change	6.24 ± 1.67	1.20 ± 0.96
70S	A→C at position 94	S32→R	59.20 ± 3.97	21.49 ± 3.23
57S	no change		40.54 ± 6.77	26.27 ± 0.45
H37Rv			40.32 ± 5.76	26.04 ± 3.68
pQE30			8.64 ± 6.23	9.24 ± 5.60

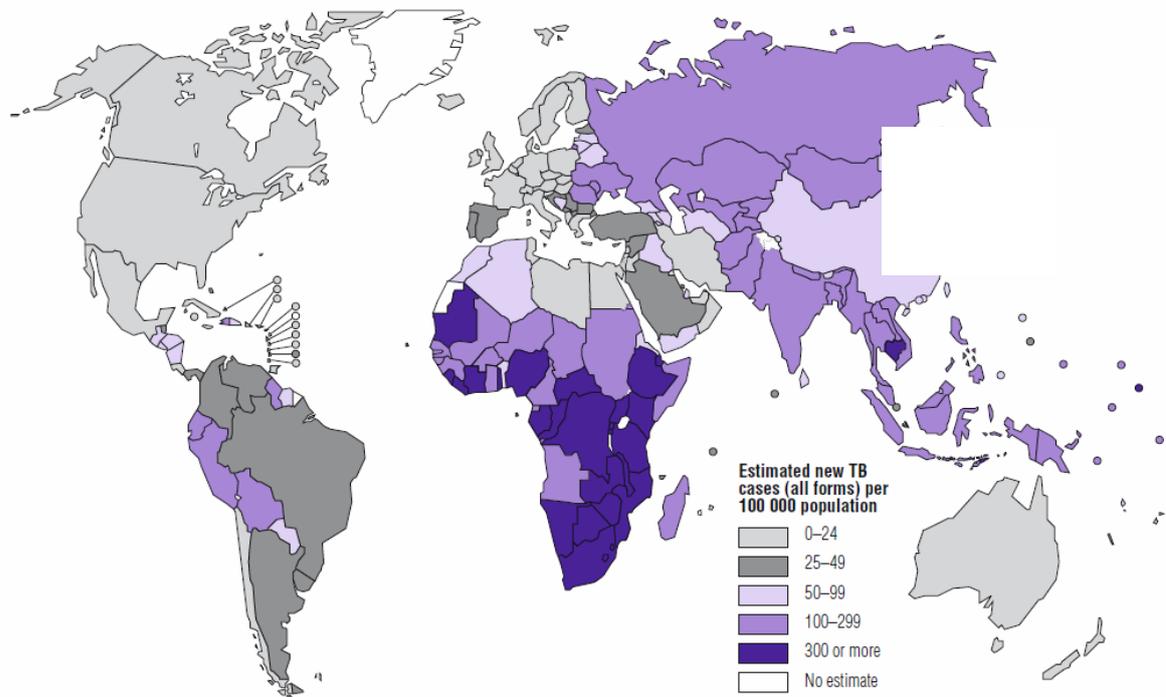
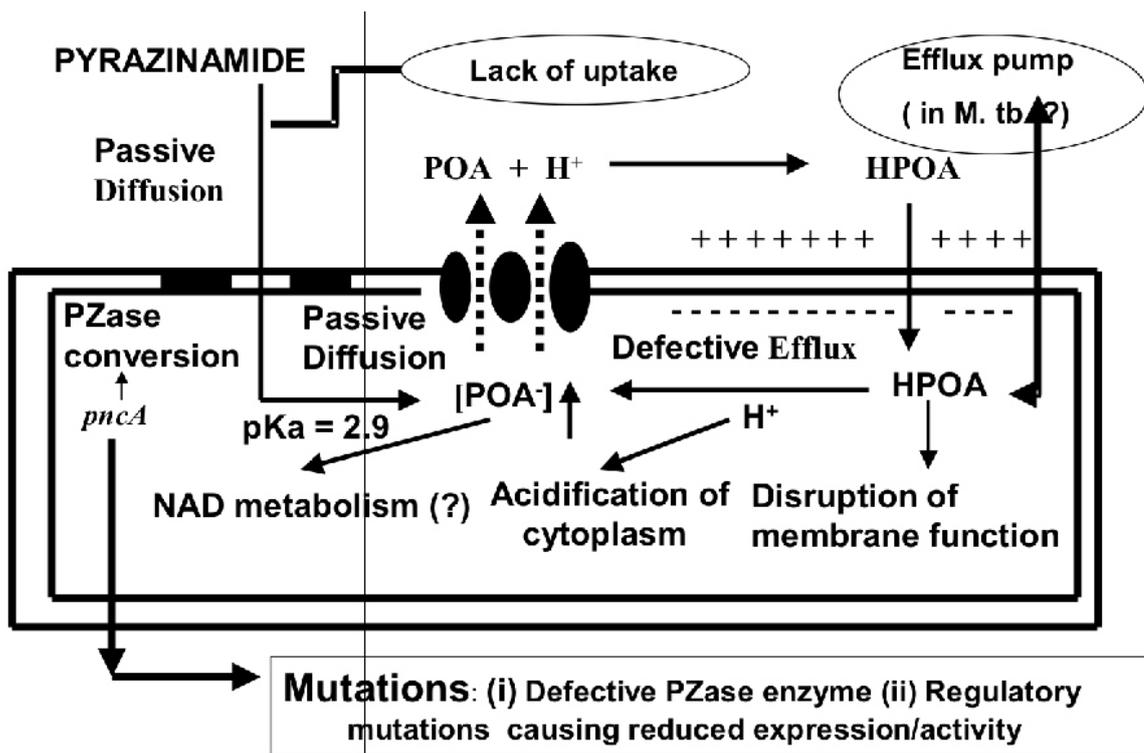
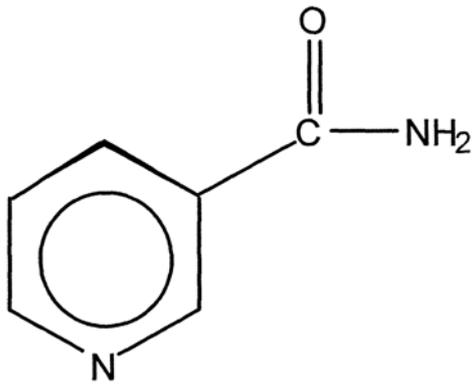


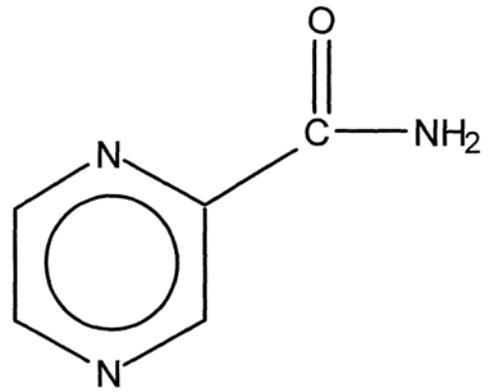
圖 一、估計結核病在全世界的發生率<sup>(2)</sup>



圖二、pyrazinamide 和其抗藥性的機轉<sup>(22)</sup>



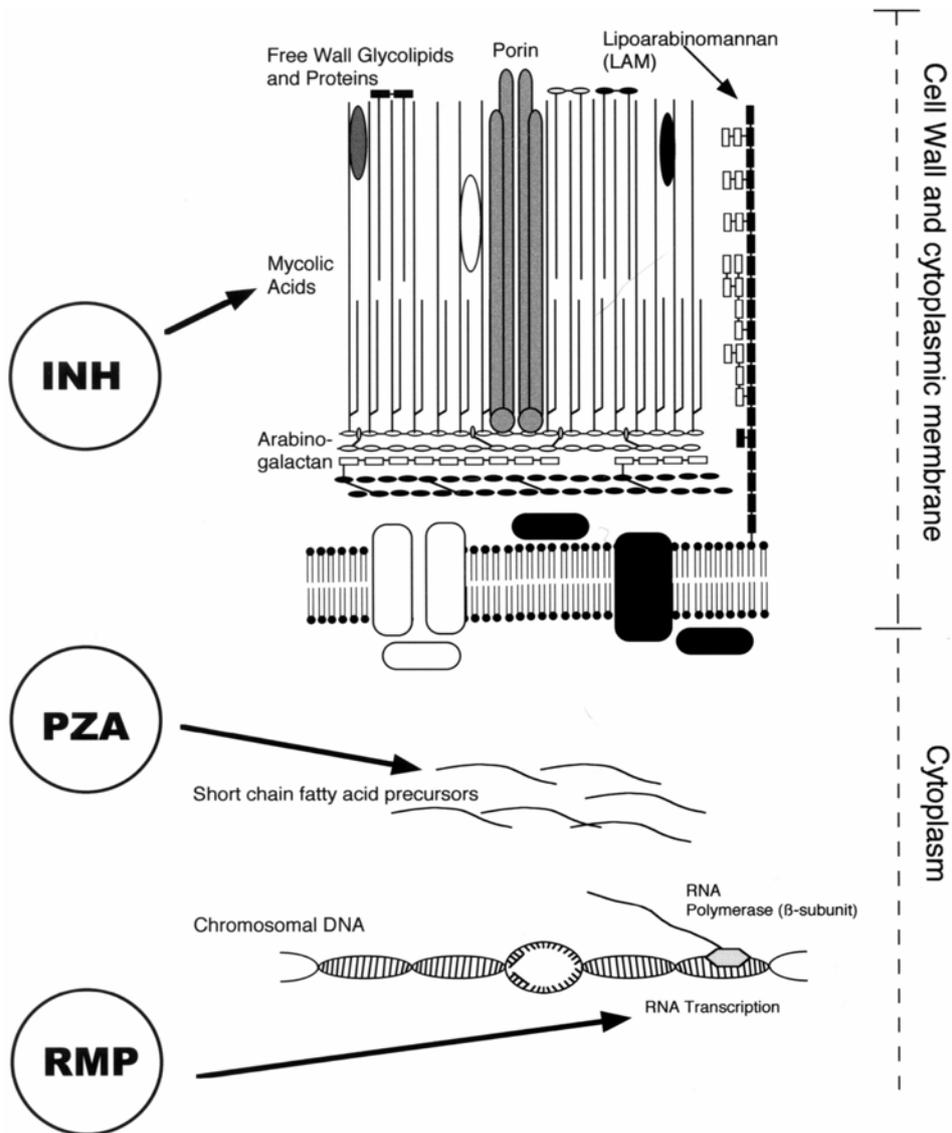
Nicotinamide



Pyrazinamide

圖三、PZA 的結構和其結構類似物





圖四、圖解 INH、PZA 和 RMP 的在 *M. tuberculosis* 細胞壁作用位置

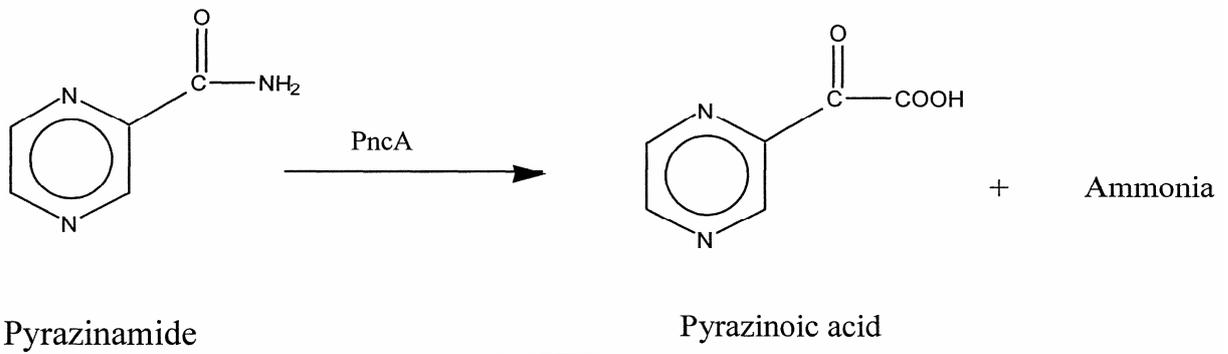
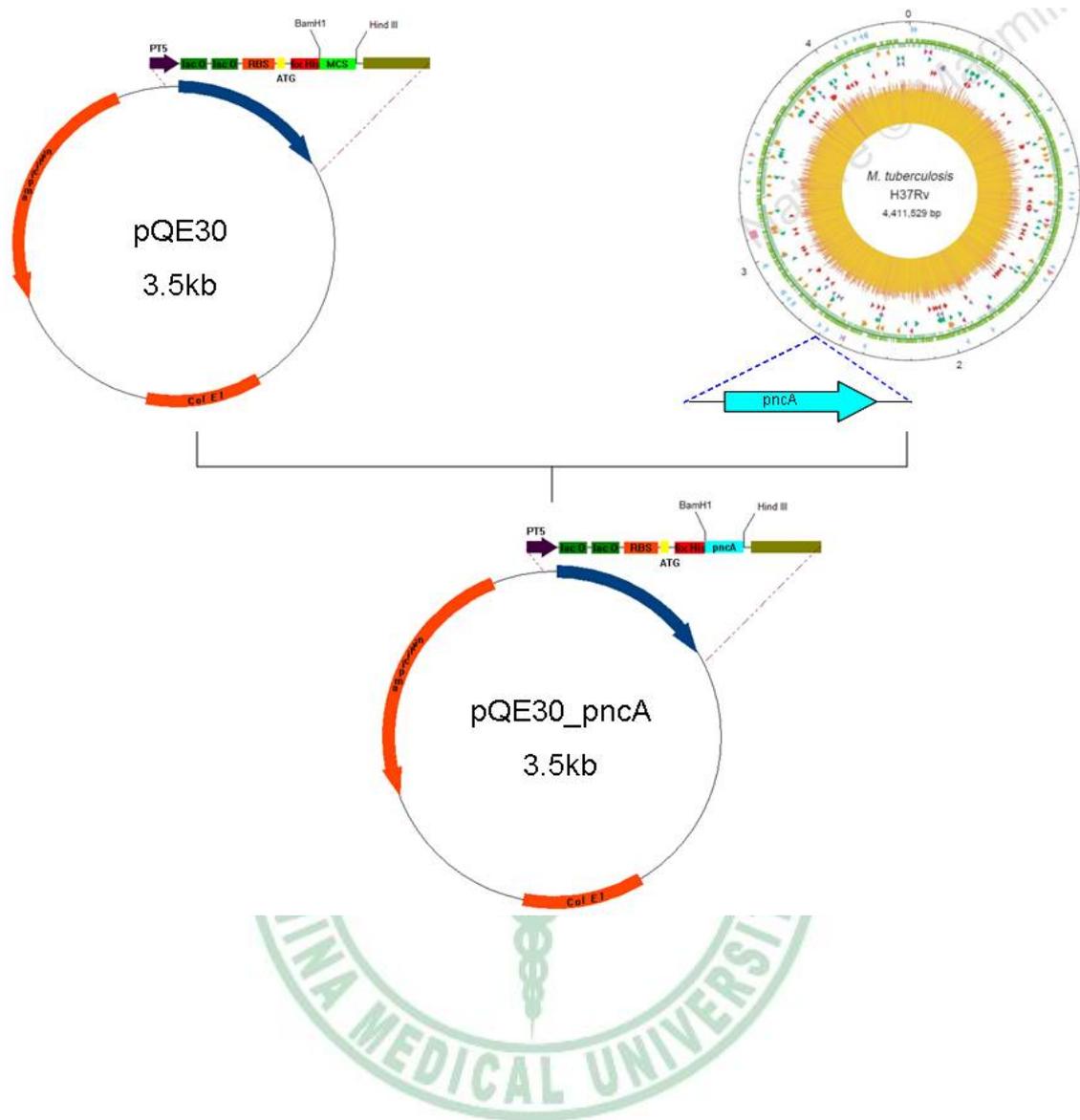


圖 五、PncA 蛋白會使 PZA 轉變成 POA





圖六、質體 pQE30-pncA 之構築

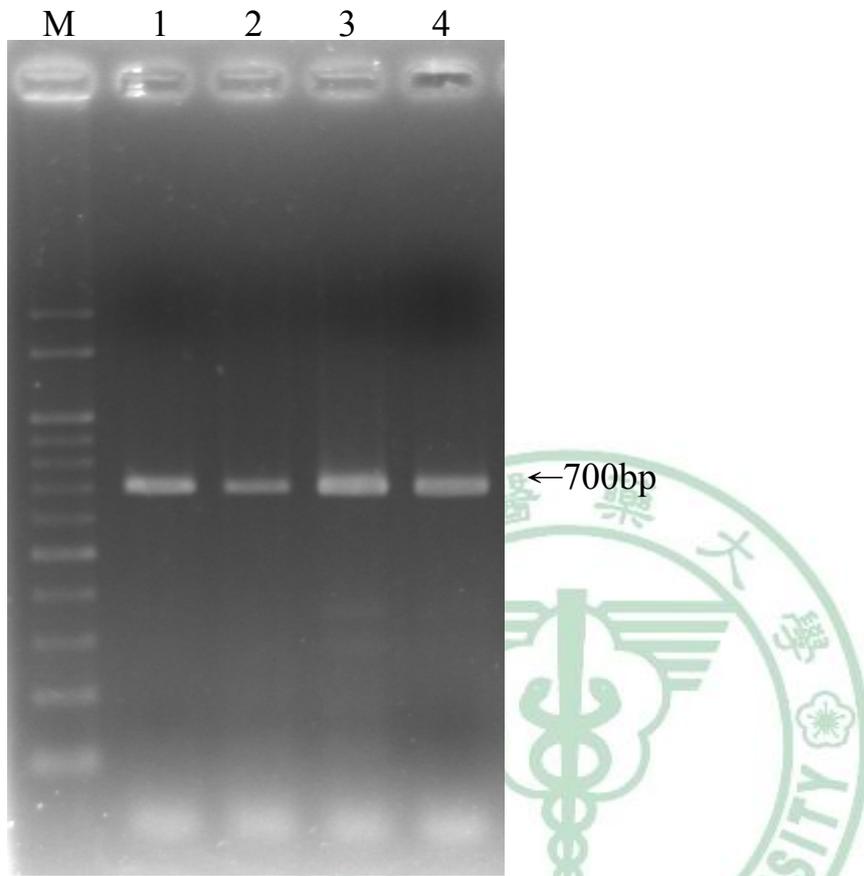


圖 七、以 pncA1 及 pncA2 為引子利用 PCR 增幅 *M. tuberculosis* pncA 基因片段之凝膠電泳圖

Lane M, 100bp marker; lane 1-4 mycobacterium tuberculosis H37Rv pncA gene

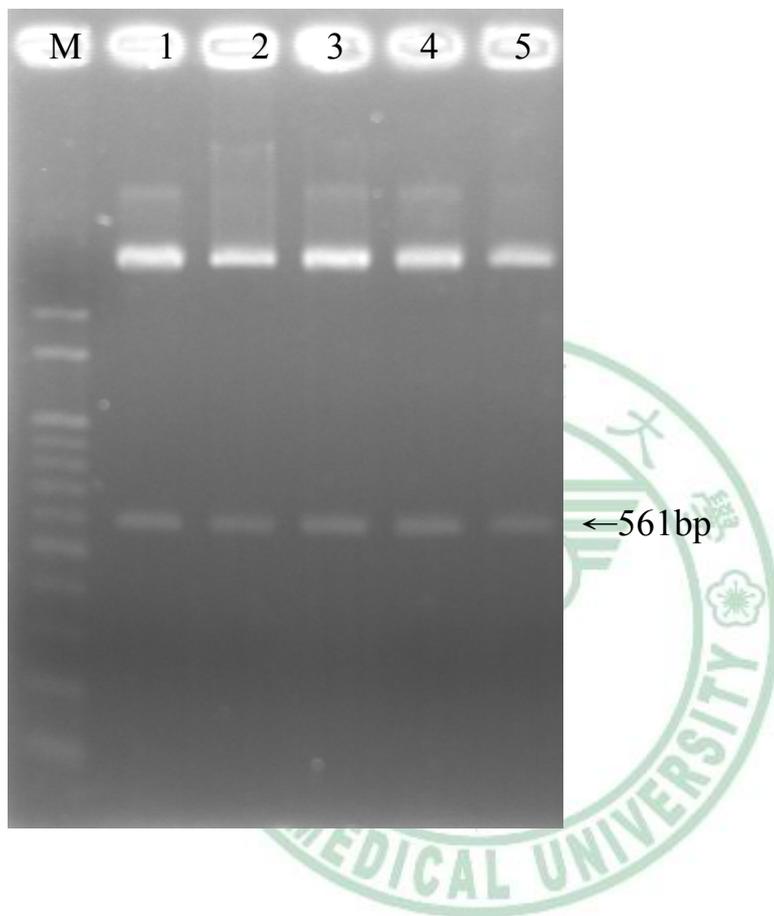
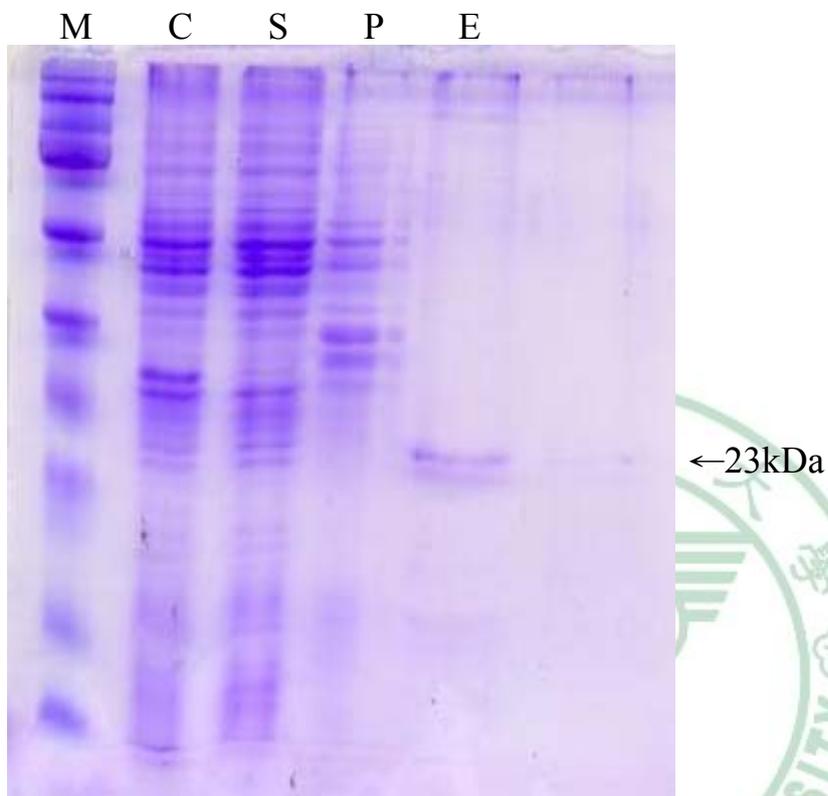


圖 八、構築質體以限制酶 BamHI 及 HindIII 切割後之凝膠電泳圖  
Lane M, 100bp markers; lanes 1-7, constructed plasmid



圖九、SDS-PAGE 分析純化 *E. coli* Novablue (pQE30-*pncA*) 所表現的 PncA 蛋白。

Lane M, protein marker; lane C, crude extract; lane S, supernatant; lane P, pellet; lane E, elution fraction.

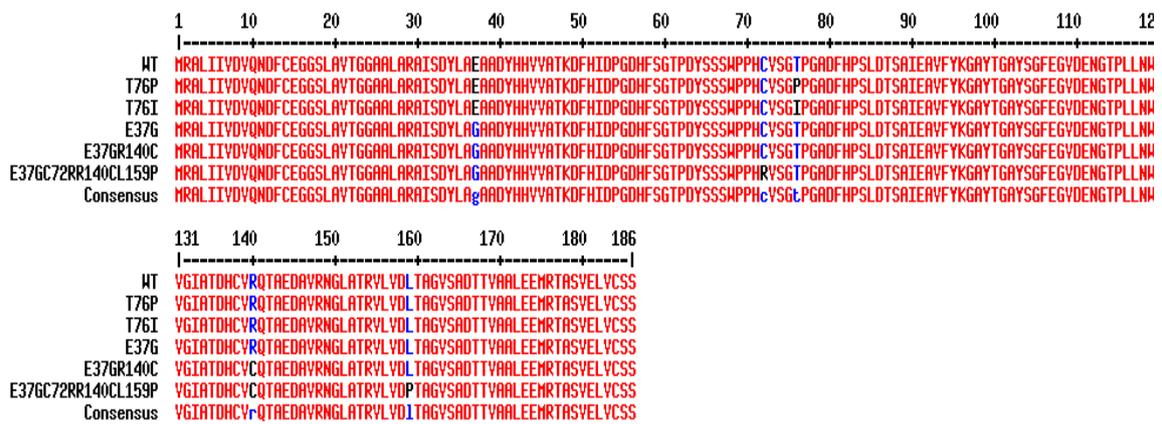


圖 十、利用 *M. tuberculosis* H37Rv PncA 蛋白和其他突變 PncA 蛋白的的比對





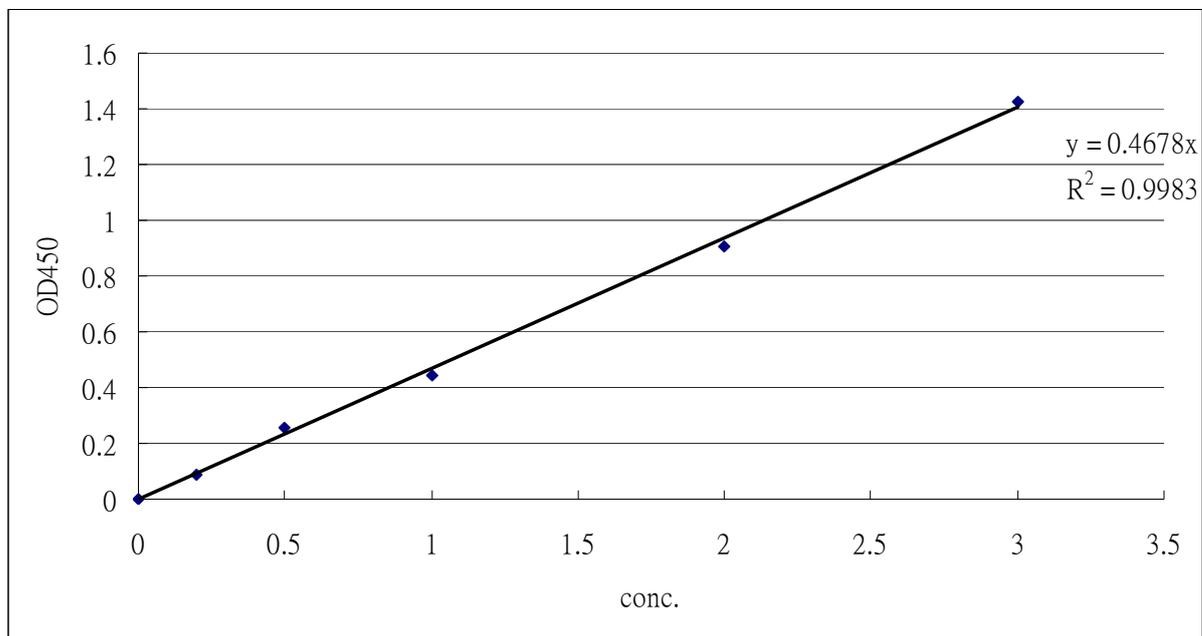
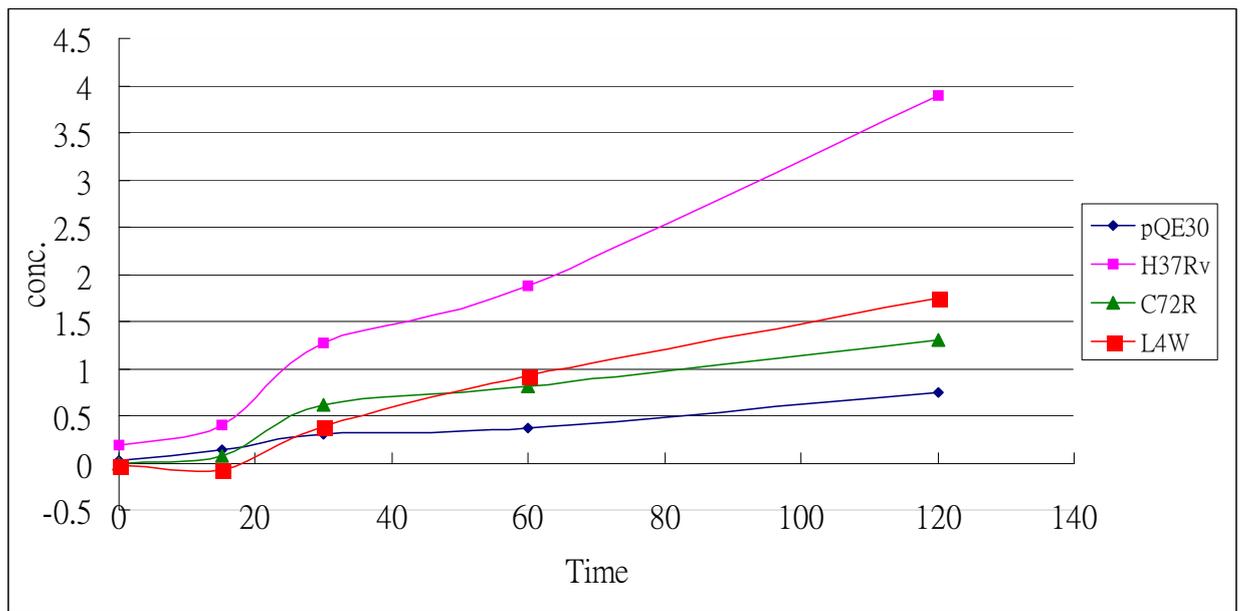


圖 十二、依照吸光值和產物變化量作標準曲線圖

(A)



(B)

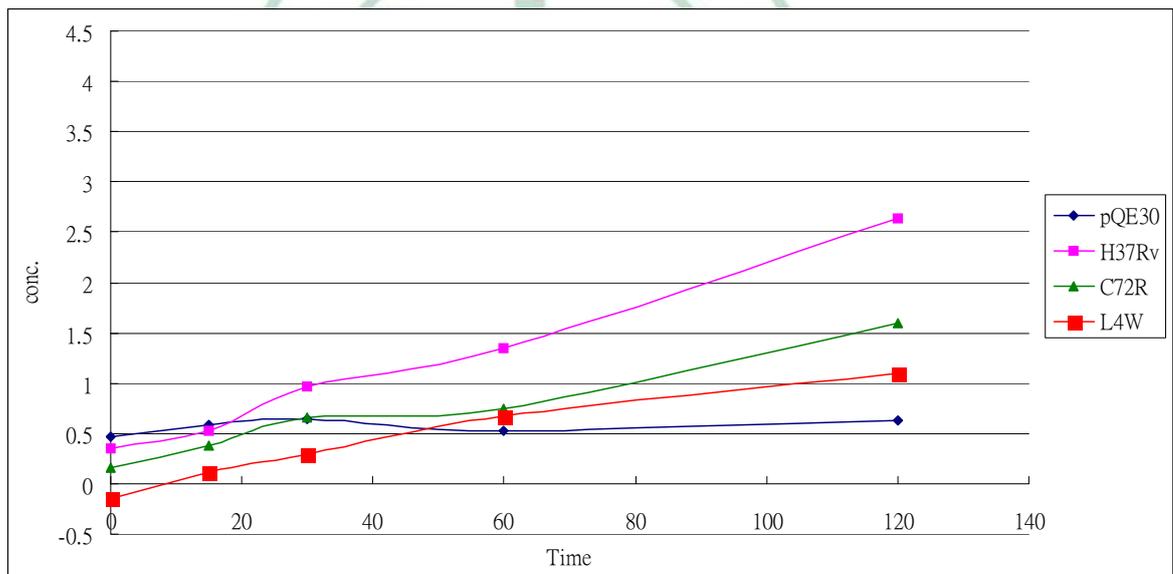
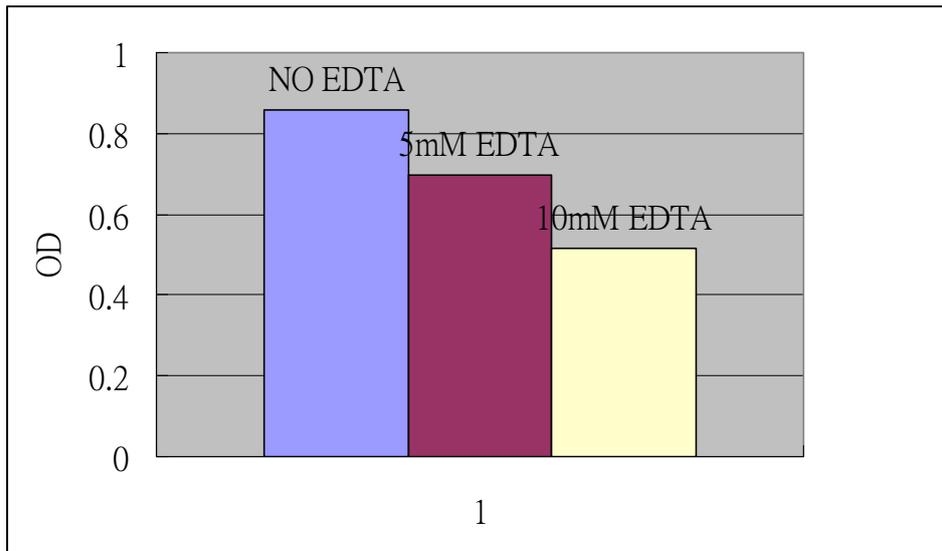


圖 十三、依照時間和產物變化量作圖(A)為未破菌狀態(B)上清液狀態

(A)



(B)

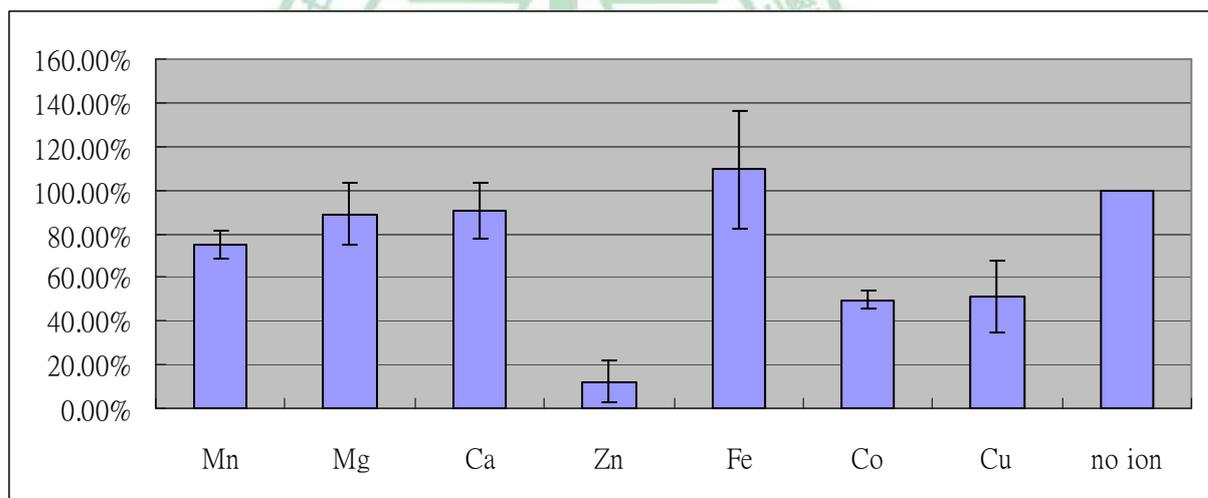


圖 十四、(A)加入不同濃度 EDTA 和活性的關係(B) 加入 10mM EDTA 後再加入不同的金屬離子會造成活性之變化

LADDER	10	20	30	40	50	60	70
M. tuberculosis	M--RALIIVD	VQNDFCEGGSLAVT	GGAALARAI	SDYLAE	AADYHH-VV	ATKDFHID	PGDHFSGTPDYSS
P. horikoshii	MPEEALIV	DMQDFMPGGALP	VEGDKIIP	KVNEYIR	KFKEK	GALIVATRD	AH--PENHIS-FRERGGP
LADDER	10	20	30	40	50	60	70

LADDER	80	90	100	110	120	130	140
M. tuberculosis	WPPHCVSG	TPGADFHPS	LDTS	AIEAVFYK	GAYTGAYS	GFEGVDEN	GTPLLNWLF
P. horikoshii	WPRHCVQ	NTPGA	EFVVDLP	EDAV--II	SKATEP	DKEAYS	GFEGTD---
LADDER	80	90	100	110	120	130	140

LADDER	150	160	170	180
M. tuberculosis	CVRQTA	EDAVR	NGLATRV	LVDL
P. horikoshii	CVRATA	LDA	LKHGFE	VYLLR
LADDER	150	160	170	180

圖 十五、利用 *M. tuberculosis* PncA 蛋白和 *Pyrococcus horikoshii* PZase 蛋白作蛋白比對



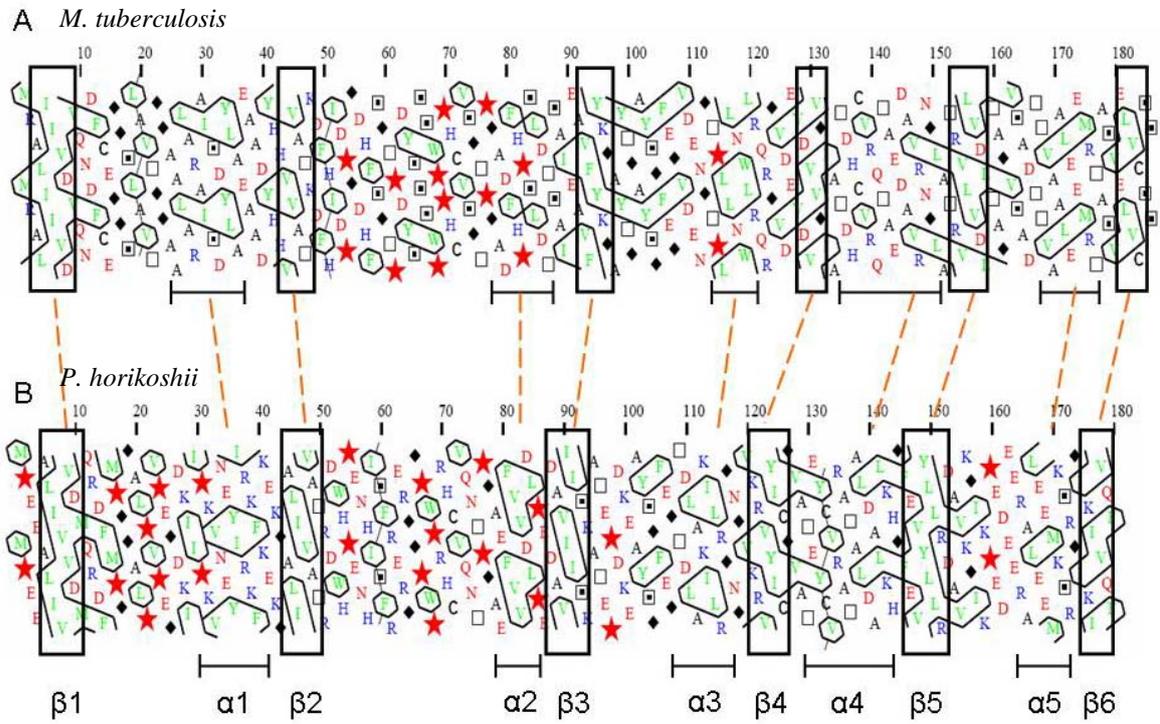


圖 十六、在兩種不同蛋白利用保守的 hydrophobic residues 比對其二級結構

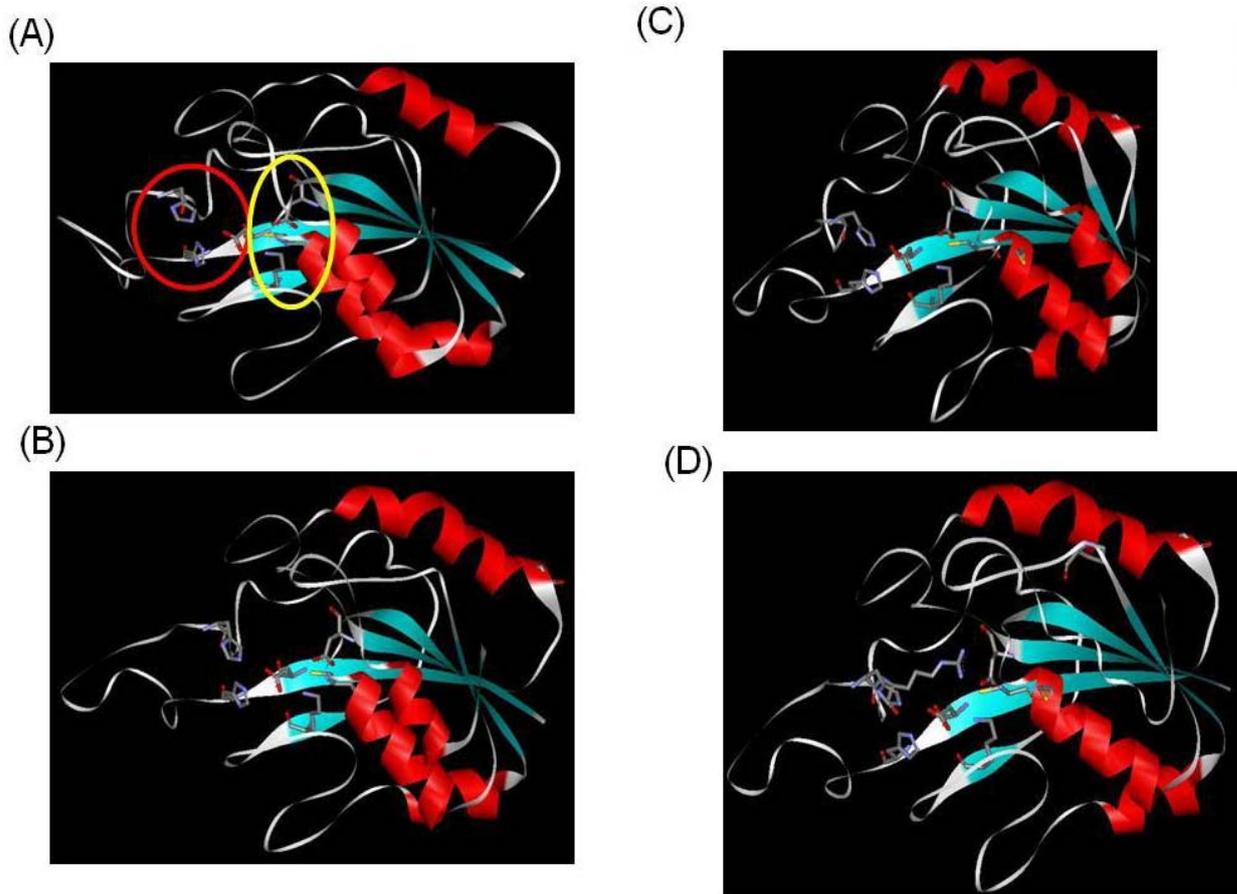


圖 十七、wide-type 和突變點多寡的模擬結構圖。(A)為 wide-type 的 PncA 蛋白(*M. tuberculosis* H37Rv) ，紅圈為金屬結合位(metal binding site) ，黃圈為活化位(active site) ；B. 突變 PncA 蛋白的第 37 個胺基酸(E37→G) ；C. 突變 PncA 蛋白的第 37 個和第 140 個胺基酸(E37→G、R140→C) ；D.突變 PncA 蛋白的第 37 個、第 72 個、第 140 個和第 159 個胺基酸(E37→G、C72→R、R140→C、L159→P) 。從結構而言，左邊緊密的結構，在基因突變後會形成鬆散的結構，而 D 圖突變以致於結構少了一個 helix 。

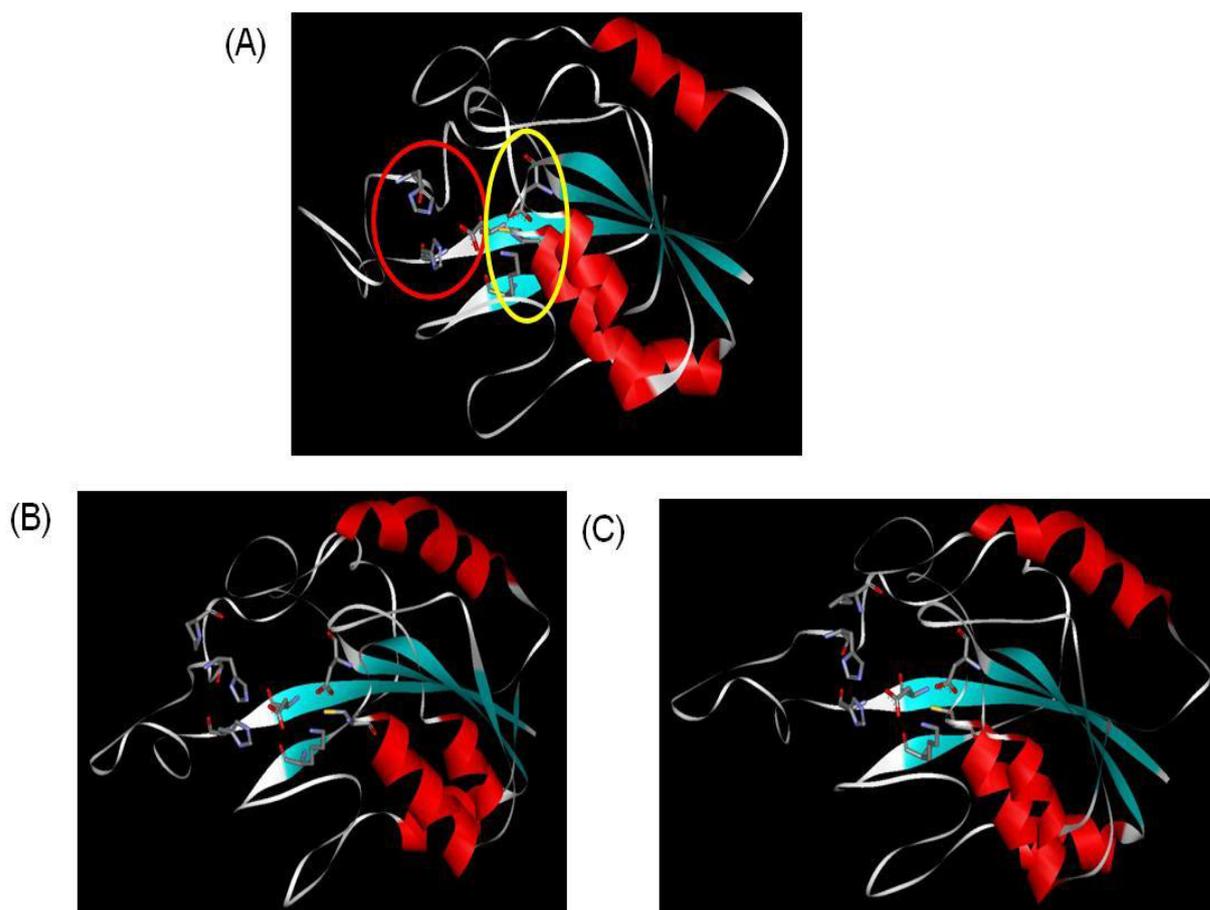


圖 十八、wide-type 與變異在胺基酸第 76 位置的模擬結構。A. 為 wide-type 的 PncA 蛋白(*M. tuberculosis* H37Rv)，紅圈為金屬結合位(metal binding site)，黃圈為活化位(active site)；B. 突變 PncA 蛋白的第 76 個胺基酸(T76→P)；C. 突變 PncA 蛋白的第 76 個胺基酸(T76→I)。B 和 C 雖然結構模擬並無太大的差異，但是實際上所測得之活性還是有些許的差異。