

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.10.007

应用抑制消减杂交技术构建耐多药结核杆菌差异表达基因 消减 cDNA 文库

张运玲, 郑改焕, 刘芮汐, 彭 哲, 李奇志, 幸琳琳, 朱朝敏

(重庆医科大学附属儿童医院感染消化科, 重庆 400014)

【摘 要】目的: 构建结核杆菌耐多药株与敏感株的差异表达消减 cDNA 文库, 进一步探索结核杆菌耐多药的分子机制。方法: 以耐多药菌株 cDNA 为实验组 (Tester), 敏感株 cDNA 为驱动组 (Driver) 应用抑制消减杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 技术结合 T/A 克隆技术构建结核杆菌耐多药株与敏感株的差异表达消减 cDNA 文库。结果: 成功构建了耐多药结核杆菌差异表达消减 cDNA 文库, 获得 113 个差异表达 cDNA 片段。结论: 研究表明 SSH 技术是筛选新功能基因的有效方法; 多种已知或未知基因均参与了结核杆菌耐多药的调节, 大规模筛选与克隆这些基因为进一步研究结核杆菌耐多药机制的产生奠定了必要的理论基础。

【关键词】结核杆菌; 抑制消减杂交; 耐多药; 差异表达基因

【中国图书分类法分类号】R394.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-14

Construction of subtracted cDNA library of differentially expressed genes of multidrug resistant tubercle bacillus by suppression subtracted hybridization

ZHANG Yunling, ZHENG Gaihuan, LIU Ruixi, PENG Zhe, LI Qizhi, XING Linlin, ZHU Chaomin

(Department of Infection and Gastroenterology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To build the subtracted cDNA library of differentially expressed genes of multidrug-resistant tubercle bacillus (MDR-TB) and to further discuss the molecular mechanism of MDR-TB. Methods: Tester was MDR-TB and Driver was sensitive tuberculosis. Suppression subtractive hybridization (SSH) and T/A cloning technology were done to build the subtracted cDNA library of differentially expressed genes of MDR-TB. Results: The subtracted cDNA library of differentially expressed genes of MDR-TB was successfully built and 113 differentially expressed cDNA fragments of MDR-TB were obtained. Sequencing and homology analysis showed that 5 of them were novel cDNA sequences and 5 sequenced genes were reported to be related with MDR in TB. Conclusions: SSH is an effective method for screening new function genes. Many genes both known and unknown are in correlation with MDR in TB. Discovery of these genes provides a solid foundation to for the explanation of MDR mechanism in TB.

【Key words】tubercle bacillus; suppression subtractive hybridization; multidrug-resistance; differentially expressed gene

耐多药结核 (Multidrug-resistant tubercle bacillus, MDR-TB) 是指至少对异烟肼和利福平 2 种或 2 种以上药物产生耐药的结核。MDR-TB 毒性大, 传播快, 病死率极高, 且无统一治疗标准, 已成为全球重大公共卫生问题和全球结核控制的障碍^[1]。众所周知, 结核杆菌耐多药的形成是由于耐药相关单基因突变, 多代遗传积累造成的, 但研究发现部分耐

多药株无相关单基因突变, 提示其耐多药存在其他分子机制, 需进一步研究。本研究拟避开传统在已知结核菌耐药相关基因中一一进行探索的实验方法, 采用抑制消减杂交结合 T/A 克隆技术, 直接从差异表达基因角度入手, 就可能参与调控结核菌耐多药产生的相关基因进行一次横向、大范围的筛选。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

由于结核菌具有地区、人群、以及基因家族的差异性, 为了排除由此可能对基因筛选带来的干扰, 设计选择重庆地区

作者介绍: 张运玲 (1983-), 女, 硕士,

研究方向: 儿科感染消化。

通信作者: 朱朝敏, 女, 教授, Email: zhuchaomin@yahoo.com.cn。

基金项目: 重庆卫生局面上资助项目 (编号: 渝卫科教 (2009) 66 号-2009-2-272)。

儿童结核临床分离株中与耐多药密切相关的北京/W 基因家族。收集我院 2003 年 8 月至 2010 年 12 月所有培养阳性的结核菌株,在已进行基因分型及耐药性分析的基础上,筛选同家族耐多药株、敏感株各 5 株用于实验^[2,3]。Trizol 由 Invitrogen 公司提供,焦碳酸二乙酯(DEPC)水、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、电泳缓冲液(TBE)、缓冲液>Loading buffer)、DNA Marker 由上海希匹吉生物技术有限公司提供,PMD-18T 载体、Taq 酶、抑制消减杂交(Suppression subtractive hybridization,SSH)试剂盒由 Clontech 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 将 2 种结核菌分别接种于固体罗氏培养基进行培养,3 周后取新鲜菌落分别接种于米氏 7H9 液体培养基进行快速培养,观察其生长状况,取对数生长期结核菌液 4 ml 离心收集用于试验。

1.2.2 RNA 的提取 取对数生长期的结核菌,高速离心,收集沉淀,加液氮充分研磨,取适量移至 1.5 ml EP 管中,加入 1 ml Trizol 试剂,按说明书进行操作提取总 RNA。用紫外分光光度仪和 1.0%的琼脂糖凝胶电泳对 RNA 进行定量定性分析。

1.2.3 抑制消减杂交

1.2.3.1 双链 cDNA 的合成 以耐多药结核菌为实验组(Tes-ter),敏感株为驱动组(Driver),按照 Clontech 公司的 SSH 试剂盒说明书进行操作。在无 RNA 酶离心管中分别加入 Tester 组和 Driver 组的 mRNA 各 2 μ g (本实验 2 μ g RNA 体积分别为:Tester 组:3.6 μ l;Driver 组:4.3 μ l),然后加入 cDNA 合成引物 10 μ mol/L 1 μ l,70 $^{\circ}$ C 温育 2 min,置冰上冷却 2 min。根据说明书建立 10 μ l 反应体系,42 $^{\circ}$ C 空气浴温育 1.5 h(注意不要使用水浴或者 PCR 仪,蒸发会减少反应物体积,使反应效率下降),置冰上终止第 1 条链合成,立即执行合成第 2 链的操作。在已经合成好的 cDNA 第 1 链反应管中根据要求建立 80 μ l 反应体系,水浴 16 $^{\circ}$ C 温育 2 h。加入 2 μ l (6U) 的 T4 DNA 合成酶,混匀,PCR 仪中 16 $^{\circ}$ C 温育 30 min,加入 4 μ l 20 $\times$ EDTA/Glycogen Mix 终止第 2 链的合成。溶解并沉淀 cDNA 双链于 50 μ l 双蒸水中(沉淀需立即处理,如长期处于-20 $^{\circ}$ C 会沉淀不需要的盐类)。

1.2.3.2 Rsa I 酶切 向纯化的双链 cDNA 中加入 1.5 μ l Rsa I 酶(10 U/ μ l),37 $^{\circ}$ C 酶切 1.5 h,加入 2.5 μ l 20 $\times$ EDTA/Glycogen Mix 终止反应,溶解、沉淀酶切产物,-20 $^{\circ}$ C 保存用于下面实验。取 5 μ l 酶切产物于 1%的琼脂糖电泳分析酶切效果,结果表明酶切后片段大小分布在 0.1~2 kb 之间,明显比酶切前的对照短,说明酶切较完全。

1.2.3.3 接头连接 Tester 双链 cDNA 酶切产物分 2 组在 T4DNA 连接酶的作用下,分别与接头 adaptor 1, adaptor 2R 16 $^{\circ}$ C 连接过夜;加 1 μ l EDTA/Glycogen Mix 终止连接反应;72 $^{\circ}$ C 加热 5 min,使连接酶失活;-20 $^{\circ}$ C 保存样品。

1.2.3.4 2 次消减杂交 将 Tester 组连接有 adaptor 1 和 adaptor 2R 的 Tester 双链 cDNA 1.5 μ l 分别与 Driver 组双链 cDNA 1.5 μ l 混合,68 $^{\circ}$ C 下杂交 8 h;取第 1 次消减杂交的两组

反应体系混合,加新鲜变性酶切后的 driver cDNA 1 μ l,68 $^{\circ}$ C 下杂交过夜,加 200 μ l 稀释缓冲液稀释,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3.5 选择性 PCR 扩增 取 1 μ l 稀释后杂交产物,以试剂盒中提供的 Primer1 为引物,进行第 1 轮 PCR 扩增,扩增前,75 $^{\circ}$ C 停留 5 min,以延伸接头,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,25 个循环后,72 $^{\circ}$ C 6 min。取 1 μ l 第 1 轮 PCR 产物,分别以引物 Nest primer, Primer1 进行第 2 轮 PCR 扩增,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,29 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 cDNA 消减文库的构建及克隆筛选 按 pMD18-T 质粒载体说明书操作:取 4 μ l 新鲜的第 2 次 PCR 产物与 1 μ l MD18-T 载体混合,16 $^{\circ}$ C 连接过夜,-20 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ l 连接反应产物与 100 μ l 感受态大肠杆菌 DH5 α 混合,42 $^{\circ}$ C 水浴 90 s 后,加 600 μ l SOS 培养基 37 $^{\circ}$ C 250 r/min 振荡培养 80 min。将含 100 mm/ml 氨苄霉素的 LB 平板培养基使用前涂 10 μ l 浓度为 100 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷和 20 μ l 浓度为 50 mg/ml 的 X-Gal,作为蓝白斑筛选平板。离心转化产物,取沉淀涂于筛选平板,37 $^{\circ}$ C 过夜,平板上生长出的白色菌落即为阳性克隆,-70 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 阳性克隆测序及同源性分析 上述鉴定阳性结果选取 248 个单克隆样本,送北京六合华大基因公司测序。在测序所得基因序列中查找 PCR 引物去除载体序列,找出插入序列。登录 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),利用 BLAST 软件进行 DNA 序列同源性分析。

2 结果

2.1 RNA 定性定量分析

1%琼脂糖凝胶电泳清晰可见 RNA 明亮条带(见图 1),从左到右依次是 TesterRNA、DriverRNA。

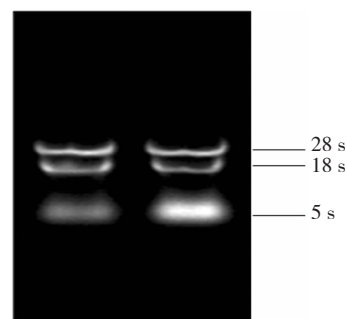


图 1 RNA 电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of RNA

2.2 消减杂交结果分析

电泳显示 2 次 PCR 扩增产物条带,扩增产物条带清晰可见。图 2 为消减杂交第 1 次 PCR 扩增结果;图 3 为消减杂交第 2 次 PCR 扩增结果。经过 2 轮消减杂交和 2 轮抑制性 PCR,Tester 中的差异表达基因得到有效的富集和扩增,可以看见明显的电泳条带,位于 200~1 000 bp 之间,说明消减杂

交较为成功。

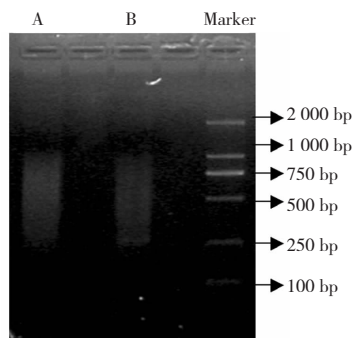


图2 第1次消减 PCR 电泳结果

Fig.2 PCR of the first subtraction

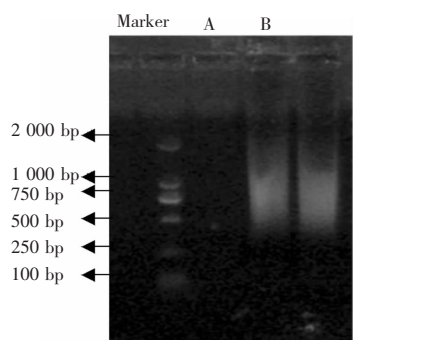


图3 第2次消减 PCR 电泳结果

Fig.3 PCR of the second subtraction

2.3 SSH 文库鉴定

随机挑取白色克隆进行 PCR 鉴定,电泳显示(图 4)大部分都能够扩增出插入片段,分布在 200~1 000 bp 大小范围内,表明这些克隆为有效克隆。所挑取的 24 个白色克隆 80% 为单一条带,这些克隆中均可能含有结核分枝杆菌耐多药株中特异性表达的 cDNA 片段。

2.4 阳性克隆序列相似性分析

利用 Blastn 软件将所获得的表达序列标签与公共数据库 GenBank 进行同源性分析(表 1)。所测序的克隆中,去除无效及重复序列,有 5 条未知表达序列标签,其余 108 个克隆均为已知基因,其主要功能分类为:①细胞壁及相关过程蛋白基因,如 Rv0987、Rv3783、Rv2318;②PPE 家族蛋白相关

基因,如 Rv3343c PPE54、Rv1918c PPE35;③参与中间代谢和呼吸活动相关基因,如 Rv3858c Rv3784、Rv3068c;④与结核杆菌毒力、解毒作用及其适应性相关基因,如 Rv2477c、Rv0783c、Rv2303c;⑤细菌脂质代谢相关基因,如 Rv2933、Rv2931、Rv3515c;⑥调控相关蛋白,如 Rv3765c、Rv2799c、Rv0984;⑦推测蛋白,如 Rv1498A、Rv2603、Rv0690c 及一些信号通路、调节蛋白及插入序列等。

3 讨论

在没有预先要求的基因序列的信息研究中,SSH 已经成为不可替代的研究微生物高通量差异表达基因的方法^[4,5],该方法对高、低丰度的差异表达基因均能有效分离,所需 mRNA 量少(1~2 μg),具有快速、简便易行、假阳性率低、重复性好等优点。Mahairas 等^[6]用该方法成功发现卡介苗 BCG 中 3 个独立基因区 RD1、RD2、RD3D 的缺失可能导致 BCG 毒力减弱,Dasgupta 等^[7]通过该技术发现 devR-devS 双元素系统在结核杆菌毒株中表达明显高于无毒株。尽管该方法获得的只是部分 cDNA 片段,但这些片段长度(200~1 000 bp)却足以用来进行同源性比较和对其编码蛋白的基序进行预测分析,还可以用它作为探针钓取基因全长。

本研究首次将 SSH 技术应用于结核杆菌耐多药相关基因的筛选,成功的构建了耐多药结核杆菌特异表达的 cDNA 消减文库,获得 113 个差异表达基因,108 个已知基因,5 个未知基因。108 个已知基因中有 5 个参与结核耐药的形成,分别是:①2 个 stable RNA:23sRNA、16sRNA,其基因突变导致结核杆菌对链霉素、丁胺卡那霉素等氨基糖苷类药物产生耐药性;②与结核杆菌毒力、解毒作用及其适应性相关基因:Rv2303c;③编码结核杆菌耐多药外排泵基因:Rv2477c、Rv0783c,其余差异基因在结核耐多药中的作用多未见报道。

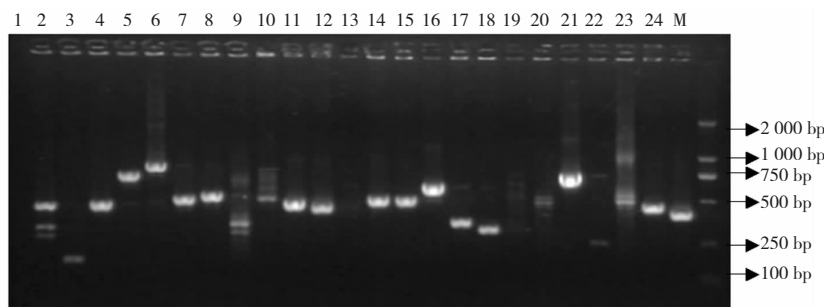


图4 部分质粒 PCR 产物电泳

Fig.4 Electrophoretogram of PCR products in the recombinant plasmid

表 1 部分阳性克隆同源性分析结果

Tab.1 Homology analysis results of some positive differentially expressed genes in MDR-TB

克隆号	登录号	分值	E值	一致性	同源基因
80	embl BX842582.1	610	2.00E-171	99	Rv3343c PPE54
166	embl BX842578.1	1 048	0	99	Rv1918c PPE35
234	embl BX842574.1	900	0	99	Rv0783c emrB
207	embl BX842576.1	1 221	0	99	Rv1498A
223	embl BX842580.1	1 029	0	100	Rv2603
214	embl BX842579.1	822	0	100	Rv2318 uspC
52	embl BX842584.1	603	3E-169	100	Rv3783 rfbD
122	embl BX842580.1	689	0	99	Rv2477c
77	embl BX842579.1	669	0	99	Rv2303c
29	embl BX842581.1	850	0	99	Rv2931 ppsA
108	embl BX842573.1	874	0	96	Rv0404 fadD30

注:分值越高,E 值越低,一致性越高其同源性越好

外排泵蛋白由 Dano 1972 年在哺乳动物细胞中发现,与耐多药密切相关,大量证据显示结核杆菌可通过主动外排系统排出许多药物,这些基因在氟喹诺酮类,氨基糖苷类,四环素类,异烟肼,利福平耐药机制中起重要作用^[8-10],由于临床分离菌株相关实验研究缺乏,其特点大多未知。本研究发现,结核杆菌耐多药外排泵基因 Rv2477c、Rv0783c 在结核耐多药菌株中的表达高于敏感菌株。Rv2477c 属于耐多药外排泵中的三磷酸腺苷结合盒超家族,其大环内酯类药物耐药相关^[11,12]。Rv0783c(emrB)编码完整的膜外排蛋白属于主要易化子超家族,可外排多种药物,已有研究证实其可外排多种抗结核药物,但具体作用底物目前尚不清楚,仍需进一步研究^[12-14]。Rv2303c 已证实其编码抗生素耐药蛋白,但其实验研究十分有限,具体作用机制及底物仍不清楚需进一步研究。

核糖体是细胞内蛋白合成的重要场所,研究表明,抗生素可通过核糖体发挥杀菌和抑菌作用,核糖体的改变可导致耐药发生。氨基糖苷类主要作用于结核杆菌的核糖体,抑制蛋白质合成。本研究发现 rrl(编码核糖体 23sRNA)和 rrs(编码核糖体 16sRNA)在多耐药株中表达上调,与之前的研究证实 rrl 和 rrs 氨基糖苷类耐药密切相关相符合^[15,16]。

本次研究筛选得到大量保守推测蛋白,其功能大多未知,在结核菌中的相关研究十分有限,但该类蛋白在其他细菌或肿瘤耐药研究中均证实其和耐药密切相关或在耐药生物体中高表达,目前已有研究证实此类蛋白在耐链霉素结核菌中高表达^[17,18]。该蛋白基因皆位于细胞壁和细胞活动基因及其调节蛋白编码基因的下游,受同一操纵子控制,编码

产物是构成结核杆菌细胞壁的重要构件,通过仅有的有关结核菌推测蛋白的研究及其它细菌相关研究推测其与结核菌毒力及耐药性相关^[19]。本研究中推测蛋白在耐多药结核菌株中的差异表达,也在一定程度上提示了其与结核菌耐多药的相关性,深入了解这种蛋白质功能有助于进一步研究细菌的生存能力和对环境改变的适应,帮助深入揭示结核菌的耐药机制,开发新的抗结核药物。

结核菌胞壁特殊的脂质结构是其天然的耐药屏障,可限制多种药物的摄取,导致药物流入细胞减少,浓度降低而无法发挥作用,从而产生抗药性^[20,21]。有研究证实,细菌在自然生长繁殖过程中及其它干扰代谢因素下发生细胞壁缺陷,形成耐药^[22,23]。本研究筛选得到 10 个细胞壁脂质代谢基因在耐多药结核菌株中差异表达,王和等证实结核杆菌不仅可在普通培养基内自发形成耐药,还可在利福平、异烟肼、乙胺丁醇的作用下发生细胞壁变异而形成非遗传性耐药^[24]。

MDR-TB 菌株和敏感株基因表达的差异可以解释其毒力和表型差异,这些差异表达基因就可能是参与耐多药形成的相关基因,对其进行分析研究将有助于彻底阐明结核杆菌耐多药的分子机制,该文库的成功建立,为进一步揭示结核杆菌耐多药相关调节基因及其调节机制奠定了基础,我们将对筛选得到的差异表达基因继续进行进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization.Global tuberculosis control:epidemiology, strategy, financing[EB/OL]. (2009-4-2)[2011-11-14].http://www.a-

mazon.com/Global-Tuberculosis-Control-2009-Epidemiology/dp/9241-56380X.

- [2] 彭 哲,朱朝敏,幸琳琳,等.结核分枝杆菌北京基因型菌株与重庆地区结核患儿耐药表型的相关分析[J].第三军医大学学报,2010,32(23):2545-2548.
- Peng Z,Zhu C M,Xing L L,et al.Correlation between Beijing genotype strains of *Mycobacterium tuberculosis* and drug-resistant phenotypes in Chongqing children with tuberculosis[J].Journal of Third Military Medical University,2010,32(23):2545-2548.
- [3] 刘芮汐,彭 哲,朱朝敏,等.MIRU-VNTR 和 Spoligotyping 用于重庆地区 210 株儿童结核分枝杆菌临床分离株的基因分型[J].中华流行病学杂志,2011,32(6):593-597.
- Liu R X,Peng Z,Zhu C M,et al.Genotyping of 210 *Mycobacterium tuberculosis* strains with Spoligotyping and MIRU-VNTR among pediatric tuberculosis patients in Chongqing[J].Chinese Journal of Epidemiology,2011,32(6):593-597.
- [4] Huang X,Li Y,Niu Q,et al.Suppression subtractive hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research[J].Appl Microbiol Biotechnol,2007,76(4):753-760.
- [5] Galbraith E A,Antonopoulos D A,White B A.Application of suppressive subtractive hybridization to uncover the metagenomic diversity of environmental samples[J].Methods Mol Biol,2008,410:295-333.
- [6] Mahairas G G,Sabo P J,Hickey M J,et al.Molecular analysis of genetic differences between *mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*[J].J Bacteriol,1996,178(5):1274-1282.
- [7] Dasgupta N,Kapur V,Singh K K,et al.Characterization of a two-component system,devR-devS of *mycobacterium tuberculosis*[J].Tuber Lung Dis,2000,80(3):141-159.
- [8] Cole S T,Brosch R,Parkhill J,et al.Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence[J].Nature,1998,393(6685):537-544.
- [9] Escibano I,Rodriguez J C,Llorca B,et al.Importance of the efflux pump systems in the resistance of *mycobacterium tuberculosis* to fluoroquinolones and linezolid[J].Chemotherapy,2007,53(6):397-401.
- [10] De Rossi E,Ainsa J A,Riccardi G.Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance:an unresolved question[J].FEMS Microbiol Rev,2006,30(1):36-52.
- [11] Gupta A K,Katoch V M,Chauhan D S,et al.Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-tuberculous drugs[J].Microb Drug Resist,2010,16(1):21-28.
- [12] Louw G E,Warren R M,Gey van Pittius N C,et al.A balancing act:efflux/influx in mycobacterial drug resistance[J].Antimicrob Agents Chemother,2009,53(8):3181-3189.
- [13] Cole S T,Brosch R,Parkhill J,et al.Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence[J].Nature,1998,393(6685):537-544.
- [14] De Rossi E,Branzoni M,Cantoni R,et al.mmr,a mycobacterium tuberculosis gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors[J].J Bacteriol,1998,180(22):6068-6071.
- [15] Sekiguchi J,Miyoshi-Akiyama T,Augustynowicz-Kopeć E,et al.Detection of multidrug resistance in *mycobacterium tuberculosis*[J].Journal of Clinical Microbiology,2007,45(1):179-192.
- [16] Tracevska T,Jansone I,Nodieva A,et al.Characterisation of rpsL, rrs and embB mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *mycobacterium tuberculosis*[J].Res Microbiol,2004,155(10):830-834.
- [17] Stewart J J,White J T,Yan X,et al.Proteins associated with Cis-platin resistance in ovarian cancer cells identified by quantitative proteomic technology and integrated with mRNA expression levels[J].Mol Cell Proteomics,2006,5(3):433-443.
- [18] Nan J,Brostromer E,Liu X Y,et al.Bioinformatics and structural characterization of a hypothetical protein from *streptococcus mutans*: implication of antibiotic resistance[J].PLoS One,2009,4(10):e7245.
- [19] Sharma P,Kumar B,Singhal N,et al.Streptomycin induced protein expression analysis in *mycobacterium tuberculosis* by two-dimensional gel electrophoresis & mass spectrometry[J].Indian J Med Res,2010,132:400-408.
- [20] Jungbht P R,Muller E C,Mattow J,et al.Proteomics reveals open reading frames in *mycobacterium tuberculosis* H37Rv not predicted by genamix[J].Infect Immun,2001,69(9):5905-5907.
- [21] Brennan P J.Structure,function,and biogenesis of the cell wall of *mycobacterium tuberculosis*[J].Tuberculosis(Edinb),2003,83(1-3):91-97.
- [22] Niederweis M.Mycobacterial porins—new channel proteins in unique outer membranes[J].Mol Microbiol,2003,49(5):1167-1177.
- [23] Brooks G F,Butel J S,Morse S A.Medical microbiology[M].Beijing:People's Medical Publishing House,2001:148-149.
- [24] 王 和,罗振华,徐 艳,等.细胞壁缺陷结核分枝杆菌耐药性的基因研究[J].中国抗生素杂志,2007,32(10):636-640
- Wang H,Luo Z H,Xu Y,et al.Study on the genes for drug resistance of cell-wall deficient *M. tuberculosis*[J].Chinese Journal of Antibiotics,2007,32(10):636-640.

(责任编辑:唐秋姗)