

## Ligasi Gen Rv 1980c Pengkode Protein MPT 64 KE pGEM-T *Mycobacterium tuberculosis* Sebagai Antigen untuk Immunodiagnostik Tuberkulosis Laten

Rosana Agus dan Irfandi

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Hasanuddin, Makassar, 90245

### Abstrak

Penyakit tuberkulosis yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* merupakan penyakit infeksi penyebab kematian manusia terbesar di dunia. Tantangan utama dalam pengendalian TB adalah mendiagnosis secara cepat dan tepat penyakit TB khususnya TB laten. Deteksi TB laten tidak memiliki standar baku, namun saat ini dilakukan dengan uji tuberculin skin test (TST). Prinsip uji tuberkulin adalah timbulnya hipersensitivitas pada seseorang yang terinfeksi *M. tuberculosis* terhadap komponen tuberkulin yaitu purified protein derivative (PPD). PPD mengandung kurang lebih 200 antigen mikobakteri, sehingga uji tuberkulin mempunyai keterbatasan antara lain terjadi reaksi positif palsu karena adanya reaksi silang antara PPD dan antibodi yang dihasilkan oleh vaksinasi BCG atau infeksi dengan mikobakteria bukan TB. Dengan demikian, ketersediaan reagen diagnostik untuk TB sangat diperlukan yang secara ideal dapat mengidentifikasi individu terinfeksi baru dan laten dengan resiko tinggi untuk berkembang menjadi tuberkulosis aktif.

Beberapa protein yang dikode pada daerah RD 2 *Mycobacterium tuberculosis* telah dikembangkan menjadi vaksin dan reagen diagnostik, antara lain protein MPT 64. Protein ini merupakan kandidat yang sesuai untuk pengujian diagnostik yang berbasis sel T. Protein ini dapat pula membedakan penderita TB aktif, TB laten dan orang sehat yang telah divaksin BCG.

Tujuan penelitian ini adalah untuk meligasi gen MPT 64 *Mycobacterium tuberculosis* ke sel host *Escherichia coli* JM 109 sebagai imunodiagnostik TB laten. Metode yang digunakan adalah mengkultur *M. tuberculosis* dalam medium Lowenstein Jensen, mengisolasi DNA kromosom, mengamplifikasi gen Rv 1980c (MPT 64) dengan PCR. Selanjutnya meligasi gen tersebut ke vektor kloning dan transformasi ke sel host *E. coli*. Karakterisasi klon rekombinan dilakukan dengan PCR. Hasil penelitian diperoleh beberapa koloni putih dari pGEM-T-MPT64. Setelah dilakukan karakterisasi klon diperoleh bahwa DNA sisipan yang diligasi ke vektor pGEM-T dan transformasi ke sel host *E. coli* adalah benar MPT 64.

Kata kunci: MPT 64, kloning, *Mycobacterium tuberculosis*, TB laten

### PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Penyakit ini biasanya mempengaruhi paru-paru (TB paru) tetapi dapat juga mempengaruhi daerah lain. Penyakit ini menyebar di udara ketika orang-orang yang menderita penyakit TB paru mengeluarkan bakteri TB, misalnya dengan batuk (WHO, 2015). *Mycobacterium*

*tuberculosis* merupakan bakteri yang mempunyai kandungan lemak yang tinggi pada membran selnya sehingga menyebabkan bakteri ini menjadi tahan terhadap asam. Bakteri ini tidak tahan terhadap sinar ultraviolet, karena itu penularannya terjadi di malam hari (Tabrani, 2010).

Kasus tuberkulosis di Sulawesi ditemukan sekitar 22.597 kasus, dengan jumlah kasus tertinggi terdapat di Provinsi Sulawesi Selatan yaitu sekitar 8.297 kasus. Khusus di Kota Makassar, berdasarkan data yang diperoleh dari Bidang Bina Pencegahan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Dinas Kesehatan Kota Makassar, angka penemuan penderita baru TB Paru BTA+ tahun 2013 sebanyak 72,44 % (ditemukan 1.811 penderita dari sebanyak 2.500 sasaran), jumlah ini meningkat dari tahun 2012 dengan jumlah penderita sebanyak 1.324 dari 1.641 sasaran (Dinas Kesehatan Makassar, 2014).

Menurut Martin dan Hasibuan (2010) infeksi TB terjadi karena inhalasi *droplet nuclei* yang mengandung kuman tuberkulosis. Setelah terpapar kuman TB ada empat keadaan yang bisa terjadi yaitu pertama tidak terjadi infeksi (ditandai dengan tes kulit tuberkulin yang negatif), kedua terjadi infeksi kemudian menjadi TB yang aktif (TB primer), ketiga menjadi TB laten dimana mekanisme imun mencegah progresivitas penyakit menjadi TB aktif dan keempat menjadi TB laten tetapi kemudian terjadi reaktivasi dan berkembang menjadi TB aktif dalam beberapa bulan sampai beberapa tahun kemudian.

Tes tuberkulin merupakan satu-satunya metode yang digunakan secara luas untuk mengetahui seseorang sudah terinfeksi tuberkulosis paru. Namun tes ini memiliki beberapa kelemahan yaitu uji tuberkulin hanya bisa menentukan bahwa seseorang pernah terinfeksi kuman TB, tetapi tidak bisa menentukan apakah infeksi TB tersebut masih berlangsung atau sudah tidak aktif. Selain itu, uji ini juga tidak bisa membedakan apakah hasil positif terjadi karena infeksi TB atau karena imunisasi BCG. Oleh karena itu diperlukan pemeriksaan lebih lanjut seperti foto rontgen, pemeriksaan mikroskopis dahak, atau biakan dahak (Kenyorini, *et al*, 2006). Terdapatnya kekurangan dari TST, maka disarankan untuk melakukan uji imunodiagnostik agar hasil yang diperoleh dapat dikonfirmasi kebenarannya.

Pencarian antigen *Mycobacterium tuberculosis* yang reaktif terhadap serum penderita tuberkulosis terus dilakukan untuk menangani penderita TB yang semakin meningkat. Pada penelitian Hasegawa, *et al*. (2002) diketahui bahwa *Mycobacterium Protein Tuberkulosis* (MPT 64) merupakan antigen spesifik untuk *Mycobacterium tuberculosis*. MPT 64 merupakan protein penting yang dihasilkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. MPT 64 merupakan bagian pertama yang berinteraksi dengan sistem kekebalan tubuh inang, sehingga protein tersebut penting untuk mengaktifkan respon imun pada individu yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Yi Jiang, 2013).

Berdasarkan latar belakang di atas, perlu dilakukan produksi antigen MPT 64 dengan teknologi DNA rekombinan. Produksi antigen tersebut dapat dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan kloning gen penyandi protein MPT 64 untuk digunakan sebagai imunodiagnostik. Dihasilkannya protein tersebut akan dapat memberikan proteksi terhadap penderita TB pada usia produktif, yang pada akhirnya diharapkan dapat mengurangi angka morbiditas dan mortalitas yang disebabkan oleh TBC.

## **METODE PENELITIAN**

### **Alat**

Centrifuse (Profuge), waterbath (Memmert), vortex (Heidolph), timbangan (Kern ew), inkubator shaker (Heidolph), inkubator 1000 (Titramax 1000), inkubator (memmert), mesin

elektroforesis (bio rad), geldoc (bio rad), mikropipet (bio rad), tabung 1,5 ml dan 0,5 ml (Axygen), tabung 50 ml (Iwaki), oven (Electrolux), kulkas (LG), freezer (Gea), ice maker (Hoshizaki), autoklav (Hirayama), laminar air flow (Labconco), tabung reaksi (Pyrex), cawan petridish, erlenmeyer (Pyrex), tabung mikrosentrifuga, mikrotube (Eppendorf), tabung eppendorf, rak tabung eppendorf, power supply, gelas ukur (Pyrex), gelas kimia, mesin *heatshock*, botol reagen, spatula.

#### **Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Produk PCR MPT 64, Agarose, buffer PB, buffer PE, buffer EB, enzim T4 DNA ligasi, *2x rapid ligation buffer, nuclease free water*, plasmid pGEM-T Easy, strain *E.coli* JM 109, medium Luria Bertani (LB), CaCl<sub>2</sub>, ampicillin, IPTG, X-Gal, aquades, Tris base, asam borat, EDTA, buffer TBE, EtBr, Qiagen Kit, loading dye, marker 100 bp, NaCl, Bacto trypton, Bacto agar, Bacto yeast.

#### **Prosedur Kerja**

##### **Pemurnian produk PCR dengan Kit Geneaid, Biotech, Ltd.**

Pemurnian produk PCR menggunakan Kit Geneaid (Qiagen) yang mempunyai kolom EZ-10. Kit tersebut memiliki tahapan dalam purifikasi yaitu *gel dissociation, DNA binding, Wash* dan *DNA elution*. Pemurnian bertujuan agar mendapatkan fragmen DNA murni yang akan diligasikan ke vektor kloning.

Produk PCR hasil elektroforesis pada gel agarose diambil sebanyak 10 µL kemudian ditambahkan larutan buffer PB 50 µL dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Selanjutnya dipindahkan ke tabung spin coloum dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama satu menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan sebanyak 700 µl buffer pencuci PE ditambahkan ke dalam spin colom, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Cairan yang terbentuk dibuang, setelah itu dipindahkan ke eppendorf steril dan ditambahkan 35 µl buffer EB. Selanjutnya didiamkan selama 3 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Elektroforesis hasil purifikasi produk PCR dilakukan dengan cara membuat gel Agarosa 2 %.

##### **Ligasi DNA *orf* MPT 64 ke vektor kloning pGEM-T Easy**

Proses ligasi dilakukan dengan menggunakan T4 DNA Ligasi. Komposisi reaksi ligasi terdiri dari purif MPT 64 (sampel) 5 µL, pGEM-T Easy 1 µL, enzim T4 DNA ligase 1 µL, *2x rapid ligation buffer* 2 µL, dan *nuclease free water* 3 µL. Masing-masing komposisi dimasukkan dalam tabung 1,5 mL. Setelah semua larutan berada dalam kondisi homogen, maka akan dilakukan inkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam.

##### **Transformasi Pada Sel Kompeten *E. coli* JM 109**

###### **A. Pembuatan Sel Kompeten**

Sel kompeten yang digunakan ialah sel kompeten strain *E. coli* JM 109. Koloni tunggal *E.coli* JM 109 ditumbuhkan dalam 5 mL Medium LB (Luria Bertani). Kemudian dishaker pada 37°C selama 18 jam pada 150 rpm. Selanjutnya ke dalam 20 mL LB dimasukkan 2% kultur dan di inkubasi lagi 37°C selama 2 jam. Kultur didinginkan dalam es selama 10 menit.

Kultur sebanyak 1,5 mL dipindahkan ke tabung eppendorf. Kemudian disimpan di dalam es selama 10 menit. Sentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang, kemudian dimasukkan 300 µL CaCl<sub>2</sub>, resuspensi dan sentrifugasi lagi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan tambahkan 50 µl CaCl<sub>2</sub> dingin kemudian diinkubasi semalam pada suhu 4°C.

## B. Transformasi pada *E.coli* JM 109

Metode yang digunakan dalam transformasi ini adalah *heat shock* berdasarkan Sambrook *et al.*,(1989). Sebanyak 10  $\mu$ L produk ligasi dimasukkan ke dalam 50  $\mu$ L sel kompeten. Sebagai kontrol positif digunakan sel kompeten *Escherichia coli* tanpa penambahan antibiotik dan sel kompeten *Escherichia coli* yang ditambahkan dengan antibiotik sebagai kontrol negatif. Ketiga tabung diinkubasi dalam es selama 1 jam.

Proses *heat shock* dilakukan pada suhu 42°C selama 90 detik, kemudian diinkubasi dalam es selama 1 jam. Selanjutnya ditambahkan media LB cair sebanyak 600  $\mu$ L. Tabung diinkubasi dengan menggunakan inkubator goyang pada suhu 37°C, selama 3 jam dengan 150 rpm. Selanjutnya disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Produk ligasi sejumlah 600  $\mu$ L dipekatkan menjadi 150  $\mu$ L kemudian disebarakan masing-masing 50  $\mu$ L pada 15 mL media Luria- Bertani sehingga LB) padat yang mengandung 0,15 mg/mL ampisilin, 0,8 mg X-gal dan 0,397 mM IPTG. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam.

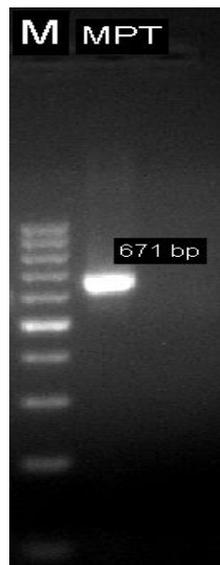
### Analisis Data

Hasil kloning Rv 1980c pengkode protein MPT 64 dianalisis berdasarkan ada tidaknya koloni putih biru yang terbentuk, kemudian data disajikan dalam bentuk gambar dan dijelaskan secara deskriptif. Koloni yang mengandung pGEM-T Easy dengan DNA sisipan gen MPT 64 akan berwarna putih. Sedangkan koloni biru merupakan *E.coli* yang hanya membawa plasmid pGEM-T Easy tanpa gen MPT-64.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Purifikasi DNA Produk dengan menggunakan Purification Kit (Qiagen)

Pada penelitian ini digunakan *purification kit* (Qiagen) untuk purifikasi produk PCR. . Pada gambar 1 dapat dilihat adanya satu band DNA yang terbentuk sebagai hasil purifikasi yang berukuran 671bp..



Gambar 1. DNA Hasil Purifikasi Ket. : M= Marker 100 bp,  
MPT= Mycobacterium Protein Tuberkulosis 671 bp

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Fu, *et al*, (2009) bahwa gen MPT 64 memiliki ukuran 671 bp. Terbentuknya band DNA yang berukuran 671 bp dan tidak terdapat dimer pada visualisasi hasil elektroforesis membuktikan bahwa purifikasi yang dilakukan telah berhasil

### **Ligasi Vektor Plasmid pGEM-T Easy dengan produk purifikasi**

Hasil purifikasi produk PCR yang telah diperoleh selanjutnya dijadikan sebagai *insert* dalam proses ligasi ke vektor kloning. Pada penelitian ini digunakan vektor kloning pGEM-T Easy karena memiliki daerah *Origin of Replication* (ORI), memiliki situs gen resisten ampisilin (Amp<sup>r</sup>) dan gen *lacZ* yang berperan dalam skrining biru-putih pada saat transformasi ke sel kompeten *Escherichia coli* JM 109. Menurut Kendrew and Lawrence (1994) vektor pGEM-T Easy merupakan plasmid linear yang memiliki basa Timin (T) menggantung (*overhangs*) pada kedua ujungnya. Daerah T-*overhangs* pada situs pemasukan *insert* dapat meningkatkan efisiensi ligasi untuk produk PCR karena mencegah terjadinya resirkularisasi.

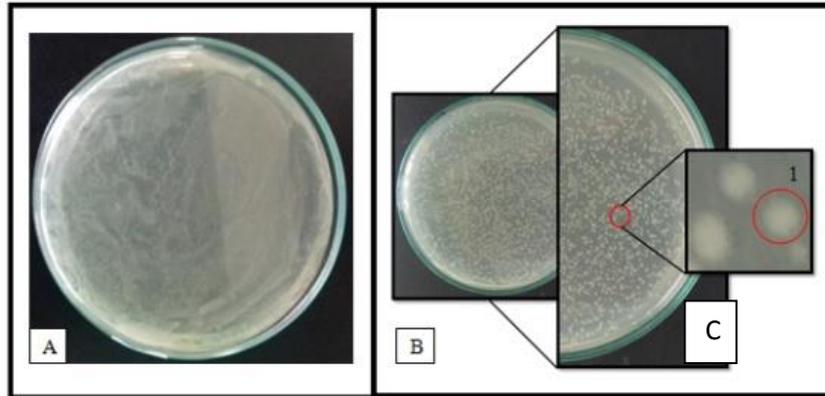
Pada penelitian ini digunakan perbandingan *insert* dan vektor 5:1. Penambahan *insert* dengan jumlah yang lebih banyak dibandingkan dengan vektor dimaksudkan untuk memperbesar peluang *insert* dalam berikatan dengan vektor yang digunakan. Suhu optimum untuk aktivitas DNA ligase yaitu berada pada suhu 30°C. Hasil dari ligasi selanjutnya ditransformasi ke dalam sel kompeten *E.coli* JM 109 dan ditumbuhkan pada media LB yang ditambahkan ampisillin, IPTG dan X-gal.

### **Transformasi Sel Kompeten *E. coli* JM 109**

Transformasi dilakukan dengan menggunakan sel kompeten *Escherichia coli* JM 109 yang berfungsi sebagai organisme yang akan memperbanyak DNA *insert*. Sel *E. coli* dibuat kompeten supaya permeabilitas dinding selnya meningkat sehingga vektor rekombinan lebih mudah masuk ke dalam sel. Menurut Radji (2011) penambahan CaCl<sub>2</sub> dingin dapat menjadikan sel *E. coli* menjadi sel kompeten. Larutan CaCl<sub>2</sub> dalam keadaan dingin efektif menyebabkan perubahan permeabilitas dinding sel bakteri.

Metode transformasi yang digunakan yaitu metode *heat shock*. Metode *heat shock* merupakan metode sederhana yang dapat menyebabkan pori-pori dari membran sel *E. coli* terbuka dalam waktu yang singkat dan siap untuk menerima vektor rekombinan yang akan masuk. Pada metode ini sel *E. coli* JM 109 diberi kejutan dengan suhu dingin dan suhu panas secara bergantian agar dinding selnya mengembang dan mengempis secara cepat sehingga memungkinkan DNA dari luar masuk ke dalam sel. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sambrook dan Russell (2001) yang menyatakan bahwa proses transformasi yang dilakukan dengan metode *heat shock* dilakukan pada suhu 42°C selama 90 detik.

Pada umumnya bakteri tidak dapat hidup pada media yang mengandung antibiotik, sehingga pada DNA plasmid yang di transformasikan harus memiliki gen penyandi resisten antibiotik sehingga bakteri yang menjadi hostnya dapat bertahan hidup pada media yang mengandung antibiotik. Hasil transformasi dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Hasil transformasi dan skrining biru putih.  
Keterangan : A = Kontrol Negatif, B = Kontrol Positif, *E. coli* JM 109  
1 = Koloni Putih, 2 = Koloni Biru

Tabel 1. Hasil Transformasi ke dalam *E.coli* JM 109

Sampel	Jumlah Koloni Putih	Jumlah Koloni Biru	Persentase	
			Koloni putih	Koloni Biru
A	1352	-	100 %	-
B	-	-	-	-
C	842	378	69 %	31 %

Tabel 1 menunjukkan bahwa proses ligasi dan transformasi sel *E.coli* JM 109 telah berhasil. Perbandingan jumlah koloni putih (sel rekombinan) : koloni biru (sel non rekombinan) adalah 2 : 1, hal ini menunjukkan proses transformasi berlangsung dengan baik (Jones, 1998).

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa pada gambar 2A (kontrol negatif) yaitu *E. coli* JM 109 sama sekali tidak tumbuh koloni pada media LB ampicillin. Hal ini disebabkan karena pada kontrol negatif hanya terdapat *E. coli* JM 109 yang tidak memiliki plasmid yang resisten terhadap ampicillin. Pada gambar 2B (kontrol positif) adalah plasmid pGEM-T Easy tanpa DNA sisipan yang diklon kedalam *E.coli* JM 109. Hasil yang diperoleh 1352 koloni berwarna putih dalam media LB ampicillin. Pada kontrol positif terdapat plasmid pGEM-T Easy yang memiliki penanda resisten ampicillin. Sedangkan hasil transformasi pada *E.coli* JM 109 yang ditambahkan oleh X-gal dan IPTG diperoleh 842 koloni bakteri berwarna putih dan 78 koloni biru (gambar 2C).

Koloni putih yang terbentuk menandakan keberhasilan dari proses kloning yaitu plasmid berhasil disisipi dengan insert. Sedangkan koloni biru merupakan koloni bakteri yang tidak berhasil disisipi gen insert. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Izzah (2011) bahwa koloni *E. coli* yang berwarna putih (sel transforman) menunjukkan DNA pengkode MPT 64 telah diligasi pada daerah MCS (*multi cloning site*) yang terdapat pada gen *lacZ* dari plasmid pGEM-T Easy. Sisipan fragmen DNA ini akan menghambat gen *lacZ* untuk mengkode subunit  $\beta$ -galactosidase, sehingga enzim tersebut tidak dapat mendegradasi substrat galaktosa yang tersedia. Koloni bakteri berwarna biru, tidak memiliki fragmen DNA sisipan sehingga dapat mendegradasi substrat galaktosa yang tersedia.

Medium LB padat yang sudah ditambahkan antibiotik ampisilin, *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG), dan X-Gal, dapat digunakan sebagai medium seleksi pertumbuhan sel kompeten yang ditransformasi. Penambahan IPTG dimaksudkan sebagai inducer transkripsi pada gen operon *lac* yaitu *lacZ*.

Gen *lacZ* akan mengkode suatu enzim β-galaktosidase yang berfungsi memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Adanya enzim β-galaktosidase dapat dideteksi dengan terjadinya pemecahan substrat X-gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside*) yang tidak berwarna menjadi galaktosa dan *5-bromo-4-chloroindigo* yang berwarna biru. Adanya enzim β-galaktosidase yang aktif akan menghasilkan koloni sel bakteri yang berwarna biru. Hal ini menunjukkan tidak adanya DNA sisipan di dalam plasmid vektor. Sebaliknya, sel yang tidak memiliki aktivitas enzim β-galaktosidase akan menghasilkan koloni sel bakteri yang berwarna putih. Hal ini disebabkan adanya sisipan fragmen DNA yang terletak diantara gen *lacZ* sehingga fragmen DNA akan menginaktivkan ekspresi dari gen *lacZ* (Madigan and Martinko, 2005).

#### **KESIMPULAN**

Gen Rv 1980c pengkode protein MPT 64 telah berhasil di ligasi ke dalam vektor kloning pGEM-T Easy dengan persentase 69%. Hal ini ditandai dengan terbentuknya koloni putih.

#### **DAFTAR PUSTAKA**

- Dinas Kesehatan Makassar. 2014. *Profil Kesehatan Kota Makassar 2013*. Pemerintah Kota Makassar. Makassar.
- Fu, R., Chun, W., Chunwei, S., Mengji, L., Zhengming, F., Jia, L., Fang, W., and Xionglin, F. 2009. "An Improved Whole-Blood Gamma Interferon Assay Based on the CFP21-MPT64 Fusion Protein". *Journals Clinical And Vaccine Immunology*. Vol. 16 [5], p. 686-691.
- Hasegawa, N., Takao, M., Koudou, I., Kazuhiro, Y., Thomas, H. L., Samuel, M., Janis, D. M., Salman, H. S. 2002. "New Simple and Rapid Test for Culture Confirmation of Mycobacterium Complex: a Multicenter Study". *Journal Of Clinical Microbiology*. Vol.40 (3), pp 908-912.
- Izzah, A., dan Agus, K. B., 2012. Analisis Tanaman Jarak Pagar Transgenik (*Jatropha curcas* L.) Menggunakan Primer Gen GusA. Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Muhammadiyah. Malang.
- Jones, P. 1998. *Vectors Cloning Applications-essential Techniques*, John Wiley & Sons. BIOS Scient Publishers. NewYork.
- Kendrew, S. J., Lawrence, E. 1994. *The Encyclopedia of Molecular Biology*. Blackwell Science. Cambridge.
- Madigan, M.T. and Martinko J.M., 2005. *Brock Biology of Microorganisms 11th ed*. Prentice Hall. New Jersey.
- Martin, U. dan P. Hasibuan. 2010. Prevalens TB Laten Pada Petugas Kesehatan di RSUP H. Adam Malik Medan. *J Respir Indo*.Vol. 30 (2).
- Radji, M. 2011. *Rekayasa genetika Pengantar Untuk Profesi Kesehatan*. Penerbit Sagung Seto. Jakarta.
- Sambrook, J., dan D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Volume 1-3. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Tabrani, R. 2010. *Ilmu Penyakit Paru*. Trans Info Media. Jakarta.
- Yi Jiang, Hairan, L., Haiyin, W., Xiangfeng, D., Xiugin, Z., Yun, B., Li, W., Guilian, L., Wen, Z., Chen, C., Kanglin, W. 2013. "Polymorphism of Antigen MPT 64 in *Mycobacterium tuberculosis* Strains ".*Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 51 (5): 1558 – 1562.