维普资讯 http://www.cqvip.com

35-38

(12)

文章编号：0253-3626（2000）01-0035-04

R516.3 R978.19

伤寒沙门菌DNA旋转酶A亚单位基因(gyrA)序列分析

肖永红，王其南
（重庆医科大学临床学院传染科 400016）

摘 要 本文利用伤寒沙门菌275(临床敏感菌株)及其耐喹诺酮类自发变异株RG1，测定其DNA旋转酶A亚单位基因(gyrA)喹诺酮类耐药决定区(QRDR)碱基序列，分析药物与细菌相互作用关系。结果发现伤寒沙门菌275 gyrA第128－434位碱基与大肠埃希菌KL-16、鼠伤寒沙门菌NCTC 74及铜绿假单胞菌PAO1相应碱基有92.51%、97.22%及77.35%同源性，推定氨基酸仅有3、2及13处变异；伤寒沙门菌RG1 gyrA仅于第247位碱基由T→G变异，相应第83位氨基酸由Ser→Ala改变，使药物与DNA旋转酶亲合力降低，萘啶酸、氧氟沙星、环丙沙星对伤寒沙门菌RG1的MIC值较对伤寒沙门菌275增加32倍以上。上述结果提示喹诺酮类抗伤寒沙门菌机制与其它细菌相同，gyrA QRDR变异是伤寒沙门菌耐药的主要原因。

关键词 伤寒沙门菌；DNA旋转酶A亚单位基因；耐喹诺酮类决定区
中国图书分类法分类号：R978 **文献标识码**：A **收稿日期**：1999-06-22

Nucleotide sequence of DNA gyrase gyrA gene from salmonella typhi

XIAO Yong-hong, et al
Department of Infectious Disease, College of Clinical Medicine

Abstract: Quinolone-resistant determining region (QRDR) of DNA gyrase gyrA genes from Salmonella typhi 275 (a clinically isolated quinolone susceptible strain) and its spontaneous quinolone resistant mutant S.typhi RG1 were sequenced and the interaction between quinolones and DNA gyrase was analyzed. The results revealed that the 128- 434 nucleotide sequence of S. typhi 275 gyrA were 92.51%, 97.72% and 77.35% identical with those of Escherichia coli KL-16,S. typhimirum NCTC 74 and Pseudomonas aeruginosa PAO1, which contributed to 3 、2 and 13 differences, respectively, in the deduced amino acids in each bacteria. In comparision with S. typhi 275, a single mutation was found at base 247 in gyrA of S. typhi RG1, which changed from T to G and led to an amino acid substitution of Ser83Ala. The mutation might be resposible for the increase of MICs of nalidixic acid, ofloxacin and ciprofloxacin on S.typhi from 2. 0.06, <0.03 to 512, 2, 1mg/L, respectively. These results indicated that the antibacterial mechanism of quinolone on S. typhi was the same as those on the other bacteria and that the mutation in QRDR of gyrA was also the major reason for quinolone resistance in S. typhi.

Key Words: Salmonella typhi; gyrA; Nucleotide sequence

DNA旋转酶为喹诺酮类作用靶位，该酶变异为细菌耐药的主要原因。伤寒为我国常见传染病，氟喹诺酮类作为主要治疗药物备受临床关注，随着该类药物广泛应用，耐药菌产生已见诸文献[1]。细菌DNA旋转酶A亚单位为药物作用主要部位，其基因(gyrA)检测及序列分析，对阐明细菌与药物的相互作用有重要价值[2]。本文就伤寒沙门菌gyrA基因耐喹诺酮类决定区核酸序列测定结果及与其它细菌比较报道如下：

作者介绍：肖永红（1965-06出生），男，副主任医师，博士

1 材料与方法

1.1 菌 株 伤寒沙门菌275(S275)为我院1996年临床病人分离所得对喹诺酮类敏感菌株，用平板法筛选其耐药变异株RG1。挑取单个S275菌落接种于10ml Mueller-Hinton肉汤(MHB，每1000ml含牛肉浸膏5g，水解酪蛋白17.5g，可溶性淀粉1.5g)，培养过夜后，以少许菌液均匀涂布于含4mg/L(2×MIC)萘啶酸(NA)的MH琼脂(MHA)，37℃孵育48h后，得耐药变异株RG1与S275共同用于下列研究。

1.2 抗菌药物及主要试剂 氧氟沙星(OFLX)由日本第一制药株式会社提供，环丙沙星(CPFX)为太原制药厂提供，NA购自Sigma公司。

维普资讯 http://www.cqvip.com


```
                                128
S typhi S275                    CGGTAACTCG    TCGCGTACGT    TACGCCATGA    ACGTACTAGT 167
S. typhi RG1                    **********    **********    **********    **********
E. coli                         *****CAC**    *********T*   **********    *********G
S typhimurium NTCT74            *****CAC**    *********T*   **********    *****T*G*G
P aeruginosa PAO1               ****GCAC**    C**T**G*T*    **T*******    G**AG**G*G

CAATGACTGG    AACAAAGCCT  ATAAAAAAT C  T GCCCGT GTC   GTT GGTGACG 217
**********    **********  **********  **********    **********
**********    **********  **********  **********    **********
**********    **********  **********  **********    **********
***C******    *****GC***  *C**G*****  C*********G    **C**C****

TAAT CGGTAA   AT ACCAT CCC  CACGGCGATT   CCG CAGT GTA   TGACACCATC 267
**********    **********  *********G    **********    **********
**********    **********  ********C*    *G**G**C**    ******G***
**********    **********  **********    **********    **********
*G********    G*****C**G  *********CA    ****G**C**    C**********

GTTCGTATGG    CGCAGCC ATT  CT CGC TGCGT   TACATGCTGG   TGG ATGGTCA 317
**********    **********  **********    **********    **********
**C**C****    **********  **********    **T*******    *A**C*****
**********    **********  **********    **********    **********
**G**C*****   *******G**  *********C    **********    *A**C**C**

GGGTAAC TTC   GGTTCT ATTG   ACGGCGACTC  CGCGGCGG CA  ATGCGTT ATA 367
**********    **********  **********  **********    **********
**********    ********C*  **********  T*********    **********
**********    **********  **********  **********    **********
***C*******   *****GG*G*   ********AA  ***C**A**C    *****A**C*

CGGAGATCCG  TCTGGCGAAA    ATCGCCCACG    AACTGATGGC   CGATCT CGAA 417
**********  **********    **********    **********    **********
****A*****  **********    **T*****T*    **********    **********
**********  **********    **********    **********    **********
*C**AG*G**  CA*****C**G    C*G*******    *****C****    G**C**G***

AAAGAGACGG    TGGA TTT  434
**********    *******
**********    *C******
**********    *******
**G**A**C*    *C**C*G
```

图1 伤寒沙门菌与大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、绿脓杆菌gyrA耐喹诺酮类决定区核苷酸序列比较
（*示与S275相同）

多聚酶链反应扩增DNA旋转酶A亚单位基因(gyrA)，上游引物为5'-TGTCCGAGATGG CCTGAAGC-3'，位于大肠埃希菌gyrA 108-127位碱基；下游引物为：

5'-TGCCGTCATAGTTAT CAACG-3'，

与大肠埃希菌gyrA 435-454位碱基互补。上述引物委托中国科学院微生物研究所基因工程中心合成，合成仪为Beckman Oligo 1000型。dNTP、Taq酶、Wizard PCR产物纯化试剂盒购自Promega公司，DNA测序用Perkin-Elmer之末端标记试剂盒。

1.3 药敏试验 以试管双倍稀释法测定抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC)。生长过夜的细菌，以生理盐水稀释为0.5 McFarland单位，加入到含倍比稀释抗生素的系列MHB中，使最终接种量为10^4～10^5CFU/ml，37℃孵育18h后观察结果，以能抑制细菌生长的最低药物浓度为MIC。

1.4 PCR扩增gyrA及产物纯化 参考文献方法进行[3]。1ml培养过夜伤寒沙门菌，离心10,000rpm，5min收集，以60μl TE缓冲液(pH8.0)混悬，加入1%SDS 30μl，37℃孵育1h后，用等量酚、酚氯仿、氯仿依次提取后作模板DNA。5ml PCR反应混合物含10mM Tris HCl（pH9.0），50mM KCl，0.1% Triton X－100，1.5mM MgCl2，0.2mM dNTP，1U Taq酶，上下游引物各50pmol，DNA模板2μl。初始循环94℃ 1.5min，60℃ 2min，72℃ 3min；后续94℃ 1min，60℃ 1min，

维普资讯 http://www.cqvip.com

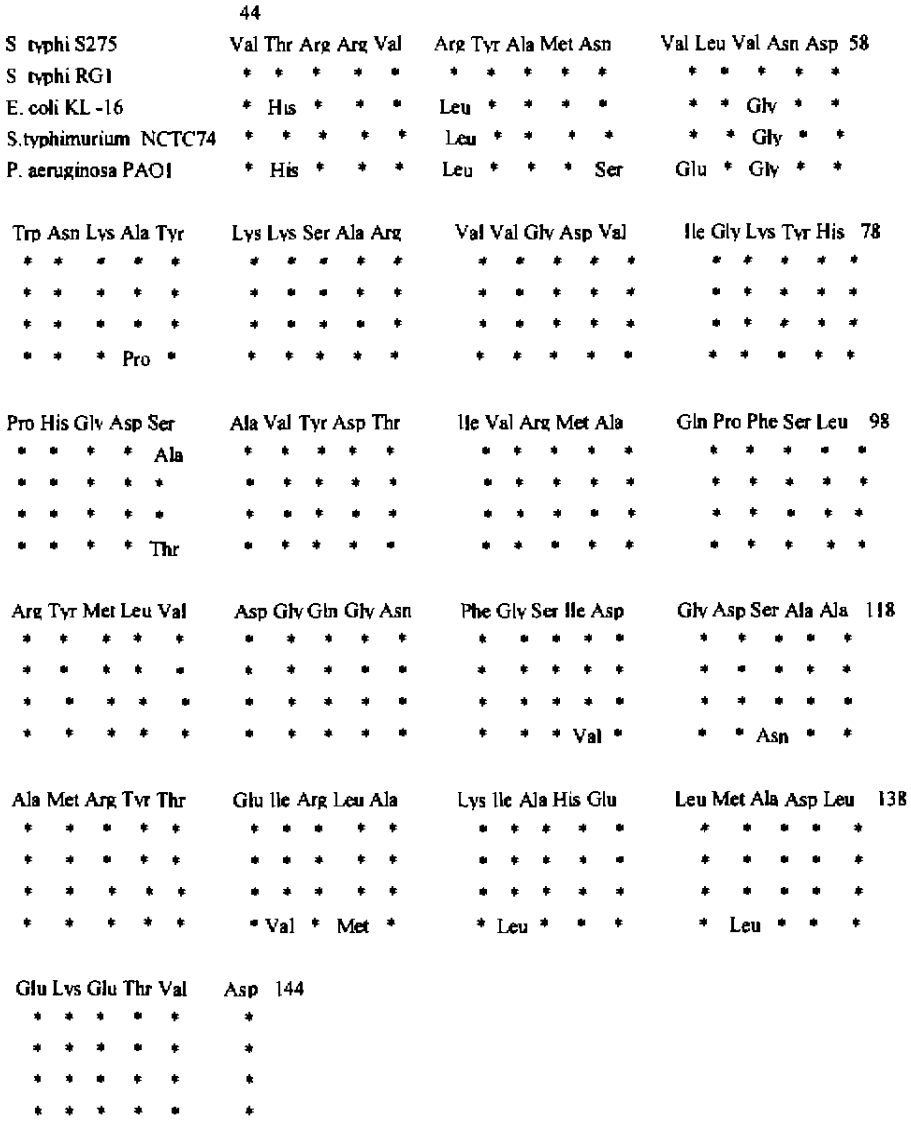


图2 伤寒沙门菌与大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、绿脓杆菌GyrA耐喹诺酮类决定区推定氨基酸序列比较
（* 均示与S275相同）

72℃ 3min，30循环；最后72℃延伸15min。产物以2%琼脂糖电泳，0.5μg/ml溴化乙锭染色，紫外灯下观察结果。

PCR产物以Promega Wizard产物纯化试剂盒纯化。60μl PCR产物加100μl纯化缓冲液后与1ml纯化树脂充分混匀，用80%异丙醇冲洗树脂柱，再经纯水过柱、收集纯化PCR产物，用于DNA序列分析。

1.5 gyrA序列分析 PCR纯化产物，以末端标记试剂盒，用前述引物，于Perkin -Elmer ABI 300型自动测序仪测序。

2 结 果

2.1 药敏试验

NA、OFLX、CPFX对S275的MIC值分别为2、0.06、<0.03mg/L，对RG1则为512、2、1mg/L，较对S275明显上升32倍或以上。

2.2 gyrA测序结果及推定氨基酸序列(图1、2)

所测伤寒沙门菌gyrA序列位于128至434位碱基，共307个碱基。S275 gyrA与大肠埃希菌KL-16高度同源，两者仅有23个碱基差异，占所测序列碱基的7.49%，且大部份为保守替换，推定氨基酸序列仅有3个差异，即第45、49与56位氨基酸分别为Thr→His，Arg→Leu与Val→Gly[4]；与鼠伤寒沙门菌NCTC 74比较，所测区域仅7个碱基差异，占2.28%，致两处氨基酸不同，即49与56位，分别为Arg→Leu与Val→Gly[5]；与铜绿假单胞菌PAO1比较有70处碱基差异，致13处氨基酸改变[6]。RG1仅于274位T→G变异，致相应第83位氨基酸由Ser变为Ala，使该位疏水性降低而与药物结合力下降，细菌敏感性降低。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

DNA旋转酶为喹诺酮类药物作用靶位，该酶通过暂时切断DNA双链，促使DNA复制转录中形成的超螺旋松解，或使松弛DNA链形成超螺旋空间构型。喹诺酮类药物通过嵌入断裂DNA链中间，形成DNA－酶－药物三者复合物，阻止DNA拓扑异构变化，妨碍细菌DNA复制、转录，以达到杀菌目的。深入研究发现，细菌DNA被切断后，末端与酶第122位酪氨酸结合，该位点在空间结构中与第88位氨基酸相邻，第88位氨基酸与其周边氨基酸共同构成喹诺酮类药物结合位点，这些位点氨基酸发生变异后，药物与酶亲合力下降，细菌敏感性降低，该区域被称为耐喹诺酮类决定区(quinolone resistant determining region，QRDR)，尤以67～106位氨基酸范围较为显著[7]。

本文通过PCR直接测序法，测定S275及耐药株RG1 QRDR序列，发现其序列与鼠伤寒沙门菌、大肠埃希菌及铜绿假单胞菌有高度同源性，相应碱基同源性达92.51%、97.72%及77.35%，推定氨基酸序列仅分别有3、2及13处差异，且大多集中于67～106位氨基酸以外，可见伤寒沙门菌DNA旋转酶A亚单位结构与其它细菌相似，喹诺酮类抗菌机理也应相近。

对伤寒沙门菌RG1序列测定，仅发现其247位碱基为G，相应83位氨基酸为Ala，与伤寒沙门菌275的T及Ser不同，导致83位点亲水性降低，药物与之亲合力下降，所测NA、OFLX及CPFX对其MIC值较对S275上升达32倍或以上。该变化与其它细菌有相似之处，敏感菌株第83位Ser被疏水氨基酸如Phe，Ile或Ala所替换[4,5,7]，为细菌耐喹诺酮类主要原因。

从以上结果可见，伤寒沙门菌与其它细菌gyrA QRDR区呈高度同源，喹诺酮类抗菌作用机理相似，伤寒沙门菌耐喹诺酮类主要机制在于该区域发生变异。

参 考 文 献

[1] 汪 复，朱德妹，张婴元. 上海部分医院细菌耐药性监测及其临床意义[J].中华传染病杂志，1996;14:149~151

[2] Willmott CJR, Maxwell A. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluroquinolone to the gyrase-DNA complex[J]. Antimicrob Agent Chemother, 1993;37:126~127

[3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 1989

[4] Yoshida H, Kogima T, Yamagishi J, et al. Quinolone resistant mutation of gyrA gene of Escherichia coli[J].Mol Gen Genet, 1988;211:1~7

[5] Griggs DJ, Gensberg K, Piddock LJV. Mutation in gyrA gene of quinolone resistant Salmonella serotypes isolated from humans and animals[J]. Antimicrob Agent Chemother, 1996;40: 1009~1013

[6] Kureish A, Diver JM, Beckthold B, et al. Cloning and nucleotide sequence of Pseudomonas aeruginosa DAN gyrase gyr A gene from strain PAO1 and quinolone-resistant strain[J]. Antimicrob Agent Chemother,1994;38:1994~1952

[7] Yoshida H,Aogaki M,Nakamura M,et al. Quinolone resistance determining region in the DNA gyrase gyrA gene of Escherichia coli[J]. Antimicrob Agent Chemother, 1990;34:1271 ~1276

（上接第52页）

[6] Little H L , Alterations in blood elements in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. Ophthalmology, 1981; 88:647～654

[7] 陈 辉，胡 楠，程新梁. 人工晶体前膜的易患因素和处理[J]. 中国实用眼科杂志, 1996;14(1):47 ～ 49

[8] Borgioli DM , Coster DJ , Fan RT, et al.. Effect of haparin surface modification of intraocular lenses on signs of postoperative inflammation after extracapsular cataract extraction[J] Ophthalmology, 1992; 99(8) : 1248 ～ 1254

[9] Moon J, Chung S, Myong Y, et al . treatment of postcataract fibrinous membrans with tissue plasminogen activator[J]. Ophthalmology, 1992; 99(8) : 1256 ～ 1259

[10] Lesser GR , Osher RH, Whipple D, et al . Treatment of anterior chamber fibrin follwing cataract surgery with tissue plasminogen activator[J]. J Cataract Refract Surg, 1993; 19(3) : 301 ～ 305

[11] Williams DF , Bennett SR, Abrams GW, et al . Low-dose intraocular tissue plasminogen activator for treatment of postvitrectomy fibrin formation[J] . Am J Ophthalmol, 1990; 109 : 606 ～ 607