

金黄色葡萄球菌氟喹诺酮的耐药性与 *grlA*、*grlB* 突变的关系

杜 锐^{1,2}, 韩文瑜¹, 雷连成¹

(1 吉林大学 农学部 畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062; 2 吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130018)

[摘 要] 为了探讨金黄色葡萄球菌的氟喹诺酮耐药性与 *grlA*、*grlB* 基因突变的关系, 从 52 株野生型金黄色葡萄球菌中筛选出 1 株对氟喹诺酮敏感的金黄色葡萄球菌, 对其进行耐药诱导, 获得一系列不同氟喹诺酮耐药水平的金黄色葡萄球菌, 并对其 *grlA*、*grlB* 基因进行 PCR 扩增、测序及序列分析。结果表明, 金黄色葡萄球菌的氟喹诺酮耐药性与 *grlB* 基因突变无关, 而与 *grlA* 的丝氨酸(Ser) 80 → 苯丙氨酸(Phe) 和谷氨酸(Glu) 84 → 赖氨酸(Lys) 突变密切相关。金黄色葡萄球菌 *grlA* 的 80 位氨基酸和 84 位氨基酸双突变是其氟喹诺酮耐药性提高的标志之一。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 氟喹诺酮; 耐药性; *grlA*; *grlB*; 基因突变

[中图分类号] Q936; R978.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)09-0005-05

Relation between fluoroquinolones-resistant and mutation of *grlA* and *grlB* gene in *Staphylococcus aureus*

DU Rui^{1,2}, HAN Wen-yu¹, LEI Lian-cheng¹

(1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun, Jilin 130062, China;

2 College of Chinese Medicine Material, Jilin Agriculture University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: The purpose was to study the relation between fluoroquinolones-resistant and mutation of *grlA* and *grlB* gene in *staphylococcus aureus*, the sensitive strain was induced with Ciprofloxacin to get grad-resistance strain of *S. aureus*, the *grlA* and *grlB* gene were amplified and sequenced by polymerase chain reaction. Sequence analysis showed that *grlB* gene had no mutation, while Ser 80 → Phe and Glu 84 → Lys of the *grlA* gene happened. These assays demonstrated that Ser 80 → Phe and Glu 84 → Lys of the *grlA* mutation were the main mark of *staphylococcus aureus* to fluoroquinolones-resistant rising.

Key words: *Staphylococcus aureus*; fluoroquinolone; drug-resistance; *grlA*; *grlB*; gene mutation

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)简称金葡菌, 是重要的人畜共患病的病原体, 临床上非常常见, 是毒力最强的化脓菌。目前, 临床上常用氟喹诺酮类药物治疗金黄色葡萄球菌感染, 但随着氟喹诺酮类药物的广泛应用, 耐氟喹诺酮类药物的金黄色葡萄球菌菌株显著增多, 已引起人们的广泛重视。大量的研究已经证明, 金黄色葡萄球菌对氟喹诺酮类药物耐药性的产生与拓扑异构酶 Ⅱ 的基因突变密

切相关^[1-5]。但拓扑异构酶 Ⅱ 基因位点的突变与金黄色葡萄球菌氟喹诺酮耐药性的确切关系尚缺乏系统研究。本试验用微量肉汤稀释法检测临床分离的 52 株野生型金黄色葡萄球菌的氟喹诺酮耐药水平, 选取 1 株对氟喹诺酮敏感的金黄色葡萄球菌进行耐药诱导, 获得一系列不同氟喹诺酮耐药水平的金黄色葡萄球菌, 应用 PCR 扩增野生型金黄色葡萄球菌和人工诱导耐药金黄色葡萄球菌的 *grlA*、*grlB* 基

*[收稿日期] 2006-08-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30170698); 吉林农业大学博士启动基金资助项目

[作者简介] 杜 锐(1971 -), 男, 吉林省前郭县人, 副教授, 博士, 主要从事分子细菌学研究。

因,并对其进行测序和序列分析,探讨金黄色葡萄球菌耐药性与基因 *grlA*、*grlB* 突变的关系,旨在为明确拓扑异构酶 基因位点的突变与金黄色葡萄球菌的氟喹诺酮耐药性关系提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株 52 株野生型金黄色葡萄球菌,由吉林大学畜牧兽医学院分子细菌学实验室用常规方法从临床分离鉴定并保存,其中 SA1、SA10 和 SA5 是分离自猪源的金黄色葡萄球菌,SA8、SA4 和 SA11 为分离自牛源的金黄色葡萄球菌。标准质控菌株 SA A TCC29213 由中国科学院菌种保存中心提供。

1.1.2 抗菌药物 诺氟沙星、恩诺沙星由浙江新昌制药有限公司提供,氧氟沙星、罗美沙星由浙江苍州中业医药有限公司提供,环丙沙星和司帕沙星由浙江海门制药厂提供。以上各药物均为白色或淡黄色粉末状原料药,纯度 98 %以上。

1.1.3 工具酶与生化试剂 *Ex TaqTM* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶为 Sigma 公司产品, RNA 酶、溶菌酶为 Ta Ka Ra 公司产品, DNA 凝胶回收试剂盒为杭州维特洁生物公司产品,蛋白酶 K 为 Invitrogen 公司产品,三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱 $C_4H_{11}NO_3$)、乙二胺四乙酸(EDTA)等为华美生物工程公司产品,十二烷基硫酸钠(SDS)、溴化乙锭(EB)、NaOH、NaCl、CaCl₂、LiCl 等为北京鼎国生物技术公司产品,琼脂糖、胰蛋白胨为 NEB 公司产品,酵母抽提

物、琼脂等为 GIBCO 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 氟喹诺酮类药物对金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度的测定 测定氧氟沙星、罗美沙星、诺氟沙星、环丙沙星、司帕沙星和恩诺沙星 6 种氟喹诺酮类药物对临床分离的 52 株金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC),具体方法参考文献[6]的微量肉汤稀释法(Microdilution Method)进行,每次测定均以标准质控菌株 SA A TCC29213 作对照,按美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)标准进行结果判定^[6]。根据最小抑菌浓度(MIC)的测定结果,计算 52 株野生型金黄色葡萄球菌对氧氟沙星、罗美沙星、诺氟沙星、环丙沙星、司帕沙星和恩诺沙星 6 种氟喹诺酮类药物的耐药率。耐药率的计算公式为:耐药率/ % = 耐药菌株数/ 测定菌株数 ×100 %。

1.2.2 耐药金黄色葡萄球菌的诱导 参考文献[7]的方法进行,用环丙沙星诱导 1 株经 1.2.1 测定对氟喹诺酮敏感的金黄色葡萄球菌菌株,将该菌株诱导驯化为不同环丙杀星耐药水平的金黄色葡萄球菌菌株,备用。

1.2.3 金黄色葡萄球菌染色体 DNA 的提取 参考文献[8]的方法进行。

1.2.4 引物的设计与合成 根据核酸序列数据库(Genbank)中 *grlA*(登录号:D67074)和 *grlB* 基因序列(登录号:D67075),设计扩增引物,其中 *grlA*、*grlB* 的上、下游引物位于报道的有耐药基因突变区域的两侧。引物序列见表 1,引物由上海生物工程公司合成。

表 1 *grlA* 和 *grlB* 基因的引物序列

Table 1 Primers of *grlA* and *grlB*

名称 Name	引物 Primer	序列 Sequence	长度/ bp Length
<i>grlA</i>	P5	5' TGAAGA TGTTTT A GGTGA TCGC-3'	22
<i>grlA</i>	P6	5' GTTGGA AAA TCA GGACCTTTAA-3'	22
<i>grlB</i>	P7	5' CGA TTAAA GCACAACAA GCAAG-3'	22
<i>grlB</i>	P8	5' CA TCA GTCATAATAATTACTC-3'	21

1.2.5 金黄色葡萄球菌 *grlA* 和 *grlB* 基因的 PCR 扩增 以 1.2.3 提取的金黄色葡萄球菌染色体 DNA 为模板,PCR 扩增 *grlA*、*grlB*。*grlA* 的 PCR 反应体系为:DNA 模板 1 μL,10 × *Ex TaqTM* Buffer (Mg^{2+}) 5 μL,dNTPs(各 2.5 mmol/L) 4 μL,P5(25 μmol/L) 2 μL,P6(25 μmol/L) 2 μL,*Ex TaqTM* (5 U/μL) 0.5 μL,灭菌去离子水 33.5 μL。扩增条件为:95 热启动 10 min 后加 *Ex TaqTM* DNA 聚合酶;94 变性 30 s,50 退火 30 s,72 延伸 30 s,30 个循环;最后 72 温育 10 min;*grlB* 的 PCR 反

应体系为:DNA 模板 1 μL,10 × *Ex TaqTM* Buffer (Mg^{2+}) 5 μL,dNTPs(各 2.5 mmol/L) 4 μL,P7(25 μmol/L) 2 μL,P8(25 μmol/L) 2 μL,*Ex TaqTM* (5 U/μL) 0.5 μL,灭菌去离子水 33.5 μL。扩增条件为:95 热启动 10 min 后加 *Ex TaqTM* DNA 聚合酶;94 变性 30 s,50 退火 30 s,72 延伸 30 s,30 个循环;最后 72 温育 10 min。反应结束后取 5 μL PCR 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳,以 DNA Marker DL-2000 为标准分子量,在紫外灯下观察电泳结果并照相。

1.2.6 PCR 产物的回收 采用杭州维特洁生物公司的 DNA 凝胶回收试剂盒,对 1.2.5 中 *grlA* 和 *grlB* PCR 扩增的目的片段进行回收。

1.2.7 金黄色葡萄球菌耐药基因 *grlA* 和 *grlB* 的序列测定与分析 将 1.2.6 中回收的 PCR 产物纯化后,直接送上海生物工程公司测序,测序后用 DNAsis 软件分析测序结果。

2 结果与分析

2.1 6 种氟喹诺酮类药物对 52 株野生型金黄色葡萄球菌的 MIC

氧氟沙星、罗美沙星、诺氟沙星、环丙沙星、司帕沙星和恩诺沙星 6 种氟喹诺酮类药物对 52 株金黄

色葡萄球菌最小抑菌浓度(MIC)的测定结果见表 2。由表 2 可知,52 株金黄色葡萄球菌株均对 6 种氟喹诺酮类药物呈现高水平耐药性,MIC₅₀ 最小为 32 μg/ mL,MIC₉₀ 最小为 128 μg/ mL。对环丙沙星、氧氟沙星、罗美沙星、诺氟沙星、司帕沙星和恩诺沙星的耐药率分别为 59.6%,53.8%,73.0%,65.3%,46.1%和 42.3%。

2.2 耐药金黄色葡萄球菌的诱导结果

用环丙沙星将氟喹诺酮敏感菌株 SA12(环丙沙星 MIC = 0.25 μg/ mL)诱导驯化为不同环丙沙星耐药水平的耐药菌,分别将其命名为 SA12-1、SA12-2、SA12-3、SA12-4、SA12-5、SA12-6、SA12-7、SA12-8、SA12-9 和 SA12-10,环丙沙星对其的 MIC 见表 3。

表 2 6 种氟喹诺酮类药物对 52 株野生型金黄色葡萄球菌的 MIC

Table 2 MICs of 6 Fluoroquinolones against 52 *S. aureus*

抗生素 Antibiotic	最小抑菌浓度(μg · mL ⁻¹) Minimal inhibitory concentration			耐药率/ % Resistant rate
	范围 Amplitude	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
环丙沙星 Ciprofloxacin	0.25 ~ 256	32	256	59.6
氧氟沙星 Ofloxacin	0.50 ~ 256	64	256	53.8
罗美沙星 Lomnoxacin	0.50 ~ 256	64	256	73.0
诺氟沙星 Norfloxacin	0.50 ~ 256	128	512	65.3
司帕沙星 Sparfloxacin	0.25 ~ 256	32	128	46.1
恩诺沙星 Enrofloxacin	0.25 ~ 128	32	128	42.3

注:MIC₅₀. 抑制 50 %细菌所需的最低浓度;MIC₉₀. 抑制 90 %细菌所需的最低浓度。
Note :MIC₅₀. 50 % minimun inhibitory concentration ;MIC₉₀. 90 % minimun inhibitory concentration.

表 3 人工诱导的 SA12 不同环丙沙星耐药水平金黄色葡萄球菌的 MIC

菌株 Strains	MICs of CIP against SA12s artificial inducement in CIP									μg/ mL
	SA12-1	SA12-2	SA12-3	SA12-4	SA12-5	SA12-6	SA12-7	SA12-8	SA12-9	SA12-10
MIC	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16	32	64	128	256

2.3 金黄色葡萄球菌提取的染色体 DNA 检测结果

从金黄色葡萄球菌中提取的基因组 DNA,经 10 g/L 的琼脂糖电泳检测,结果见图 1。由图 1 可见,从金黄色葡萄球菌中均提取到清晰的基因组 DNA 条带。

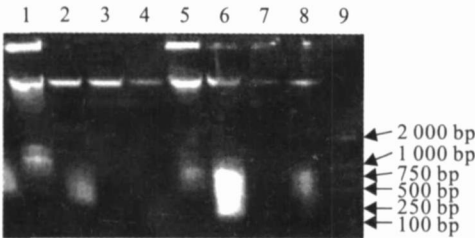


图 1 部分金黄色葡萄球菌基因组 DNA 电泳图

1. SA1;2. SA10; 3. SA8;4. SA4 ;5. SA12-2;
6. SA12-6;7. SA12-8 ;8. SA11;9. DNA Marker DL-2000

Fig. 1 Genome DNA of *S. aureus*

2.4 金黄色葡萄球菌耐药基因 *grlA* 和 *grlB* 的 PCR 扩增结果

grlA 和 *grlB* 的 PCR 扩增产物,经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,结果这两种基因在约 618 bp (*grlA*) 和 375 bp (*grlB*) 处分别扩增出特异的目的片段,与预期的片段大小吻合(图 2 和图 3)。

2.5 金黄色葡萄球菌 *grlA* 基因的序列分析结果

DNAsis 软件分析结果表明,与 GenBank 中对氟喹诺酮敏感金黄色葡萄球菌(RN4220)的 *grlA* 序列相比,6 株野生型金黄色葡萄球菌(SA1、SA10、SA5、SA8、SA4 和 SA11)和人工诱导的不同环丙沙星耐药水平的金黄色葡萄球菌 *grlA* 基因序列发生了突变,结果见表 4。由表 4 可知,当最小抑菌浓度 MIC ≤ 4 μg/ mL 时,*grlA* 基因无突变发生;当 MIC = 16 μg/ mL 时,野生型金黄色葡萄球菌 SA5 的 *grlA* 84 位氨基酸发生 Glu →Lys 的突变,而人工诱导的金黄色葡萄球菌 SA12-6 的 *grlA* 80 位氨基酸发生

Ser →Phe 的突变;当 MIC = 64 μg/ mL 时,野生型金黄色葡萄球菌 SA4 的 *grlA* 80 位氨基酸发生 Ser → Phe,84 位氨基酸发生 Glu →Lys 的突变,而人工诱导的金黄色葡萄球菌 SA12-8 的 *grlA* 80 位氨基酸

发生 Ser →Phe 突变;当 MIC ≥128 μg/ mL 时,野生型金黄色葡萄球菌 SA11 和人工诱导的金黄色葡萄球菌 SA12-9 的 *grlA* 均发生了 80 位氨基酸(Ser → Phe)和 84 位氨基酸(Glu →Lys)的双突变。

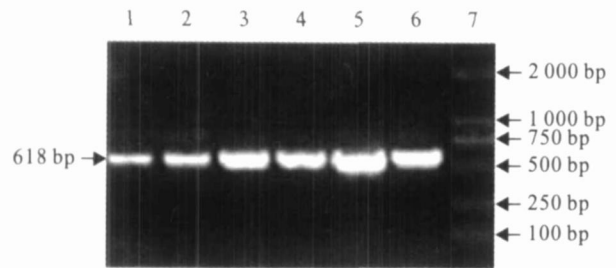


图 2 部分金黄色葡萄球菌 *grlA* 基因的扩增结果
1. SA12-9;2. SA10;3. SA4;4. SA8;5. SA11;
6. SA12-6;7. DNA Marker DL-2000

Fig.2 Electrophoregram of the *grlA* gene amplification products by PCR

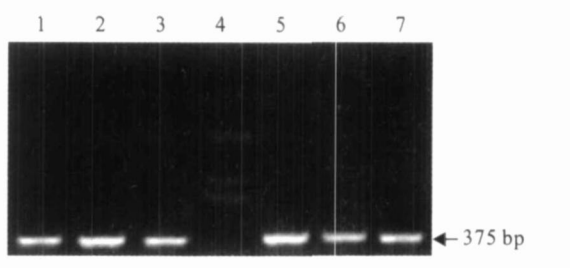


图 3 部分金黄色葡萄球菌 *grlB* 基因的扩增结果
1. SA5;2. SA12-2;3. SA1;4. DNA Marker DL-2000;
5. SA10;6. SA12-6;7. SA11

Fig.3 Electrophoregram of the *grlB* gene amplification products by PCR

表 4 不同环丙沙星耐药水平金黄色葡萄球菌 *grlA* 基因的突变情况

Table 4 Comparison results of the nucleic and amino sequence of the *grlA* in *S. aureus* that were different level of Fluoroquinolones

菌株 Strains	MIC/(μg · mL ⁻¹)	突变位点 Mutable point	氨基酸(密码子)突变情况 Mutation of amino acids
SA1	0.25	无 None	无 None
SA8	1	无 None	无 None
SA10	4	无 None	无 None
SA5	16	84	Glu(GAA) →Lys(AAA)
SA4	64	80	Ser(TCC) →Phe(TGC)
SA4	64	84	Glu(GAA) →Lys(AAA)
SA11	128	80	Ser(TCT) →Phe(TTT)
SA11	128	84	Glu(GAA) →Lys(AAA)
SA12	0.25	无 None	无 None
SA12-2	1	无 None	无 None
SA12-4	4	无 None	无 None
SA12-6	16	80	Ser(TCC) →Phe(TGC)
SA12-8	64	80	Ser(TCC) →Phe(TGC)
SA12-9	128	80	Ser(TCC) →Phe(TGC)
SA12-9	128	84	Glu(GAA) →Lys(AAA)

注:Ser 为丝氨酸,Phe 为苯丙氨酸,Glu 为谷氨酸,Lys 为赖氨酸。
Note:Ser serine,Phe is phenylalanine,Glu is glutamic acid,Lys is lysine.

2.6 金黄色葡萄球菌 *grlB* 基因的序列分析结果
DNAsis 软件分析结果表明,与核酸序列数据库(Genbank)中的金黄色葡萄球菌 *grlB* 序列相比,6 株野生型金黄色葡萄球菌(SA1、SA10、SA5、SA8、SA4 和 SA11)和人工诱导的不同环丙沙星耐药水平金黄色葡萄球菌 *grlB* 的基因序列,均未发生突变。

3 讨 论

3.1 *grlA* 基因的突变与金黄色葡萄球菌氟喹诺酮耐药性的相关性
金黄色葡萄球菌拓扑异构酶 是细菌细胞生长

所必需的酶,由 1 对 C 亚基和 1 对 E 亚基组成,分别由 *grlA* 和 *grlB* 基因编码,其功能与 DNA 复制有关,主要参与 DNA 复制末期多重连接子代染色体的解链。氟喹诺酮作用于金黄色葡萄球菌拓扑异构酶,使金黄色葡萄球菌生长被抑制,最终导致金黄色葡萄球菌死亡。国外一些研究者在测定氟喹诺酮抑制拓扑异构酶 的解链功能时,发现在金黄色葡萄球菌中,拓扑异构酶 是氟喹诺酮作用的初始靶位,当金黄色葡萄球菌的氟喹诺酮耐药性增加时,*grlA* 基因发生突变,突变局限在氨基酸残基 64 ~ 103 区域,被认为是 *grlA* 上的多药耐药区^[1-5]。目

前, *griA* 基因突变与金黄色葡萄球菌氟喹诺酮耐药性的确切关系还缺乏系统研究。本试验通过对不同氟喹诺酮耐药水平的金黄色葡萄球菌 *griA* 基因的扩增和序列分析, 结果表明, Ser 80 → Phe 和 Glu 84 → Lys 的突变与金黄色葡萄球菌的氟喹诺酮耐药性密切相关, 是金黄色葡萄球菌耐药水平高的标志之一。

3.2 *griB* 基因突变与金黄色葡萄球菌氟喹诺酮耐药性的相关性

griB 基因编码拓扑异构酶 的 E 亚基, 负责催化 ATP 的水解。Takahashi 等^[3] 首次报道, *griB* 天冬氨酸(Asp) 432 → 缬氨酸(Val) 的突变, 但与细菌氟喹诺酮耐药性无关。Fournier 等^[5] 将存在突变的 *griB* 基因 PCR 扩增产物重组质粒转入敏感菌中, 导致细菌对氟喹诺酮的耐药性增加, 其可能的机制为突变降低了内源性酶的催化活性。一些研究发现, 在金黄色葡萄球菌氟喹诺酮耐药菌株中存在一些 *griB* 基因的突变, 如谷氨酸(Glu) 422 → 天冬氨酸(Asp), 天冬氨酸(Asp) 432 → 甘氨酸(Gly), 脯氨酸(Pro) 451 → 丝氨酸(Ser) 等, 但这些突变与金黄色葡萄球菌耐药性的关系不明确^[9-10]。本试验并未发现 *griB* 基因的突变, 进一步证实了金黄色葡萄球菌的氟喹诺酮耐药性与 *griB* 基因突变无关。

[参考文献]

- [1] Yamagishi A, Kojima T, Oyamada Y, et al. Alterations in the DNA topoisomerase *griA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(5): 1157-1163.
- [2] Ferrerol, Cameron B, Crouzet J. Analysis of *gyrA* and *griA* mutations in step wise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(7): 1554-1558.
- [3] Takahashi H, Kikuchi T, Shoji S, et al. Characterization of *gyrA*, *gyrB*, *griA* and *griB* mutations in fluoroquinolones - resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Chemother*, 1998, 42(1): 49-57.
- [4] Wang T, Tanaka M, Sato K. Detection of *griA* and *gyrA* mutations in 344 *Staphylococcus aureus* strains [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(2): 236-240.
- [5] Fournier B, Hooper D. Mutations in topoisomerase and DNA gyrase of *Staphylococcus aureus*: novel pleiotropic effects on quinolone and coumarin activity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(1): 121-128.
- [6] National Committee for Clinical Laboratory Standards. M100-S9 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Ninth informational supplement [S]. Wayne Pa: NCCLS, 1999.
- [7] 雷 军, 王浴生. 国产氟喹诺酮药物体外耐药性研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 1993, 18(3): 224-228.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金东雁, 黎孟枫, 侯云德, 等, 译校. 北京: 科学出版社, 1993: 19-22, 42-48, 55-56.
- [8] Ito H, Yoshida H, Bogaki-Shonai M, et al. Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(9): 2014-2023.
- [9] Tanaka M, Onodera Y, Ariyoshik, et al. Inhibitory activities of quinolones against DNA gyrase and topoisomerase purified from *Staphylococcus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(7): 2362-2366.
- [10] Schmitz F J, Jones M E, Homfann B, et al. Characterization of *griA*, *griB*, *gyrA*, and *gyrB* mutations in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* and effects of mutations on ciprofloxacin MIC [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(5): 1249-1252.