

· 实验研究 ·

淋球菌临床分离株外膜蛋白 PI 基因序列与耐药性关系初探

雍刚 汪东篱 滕毅 沈圣 邱晋 谢志梅 裴晓方

【摘要】 目的 研究成都地区淋球菌临床分离株 PI 基因序列与青霉素和四环素耐药性的关系。方法 用 T-A 克隆的方法得到 PI 基因克隆重组子,对 PI 基因测序后,用序列分析软件进行分析。同时测定青霉素和四环素对淋球菌的最低抑菌浓度,比较耐药性与 PI 基因序列的相关关系。结果 成功克隆并测序淋球菌 PI 基因,17 条 PI 序列根据 blastn 结果可分为 PIA 和 PIB 两类。序列在影响淋球菌耐药性的第 120 和 121 位的氨基酸序列仅有部分发生单位点的 D 突变,未见文献报道的双位点 D 突变。5-9、6-1 两条序列在 120 位发生 K 突变,且 2 株菌的耐药性均处于中等水平,与文献报道一致。结论 成都地区淋球菌临床分离株外膜蛋白 PI 的序列与染色体介导的青霉素和四环素耐药性可能存在一定的相关关系,是否与 PI 基因序列 120 和 121 位氨基酸残基突变相关,还有待调查更多的临床分离株。

【关键词】 淋球菌; 耐药性; PI 基因; 序列分析

A primary study on the relationship between amino acid mutations in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* and their resistance to antibiotics YONG Gang*, WANG Dong-li, TENG Yi, SHEN Sheng, QIU Jin, XIE Zhi-mei, PEI Xiao-fang. *People's Hospital of Sichuan Province, Chengdu 610031, China

Corresponding author: PEI Xiao-fang, Email: xxpei@sina.com

【Abstract】 Objective To identify the relationship between amino acid mutations in *Neisseria gonorrhoeae* isolates and their antibiotic resistance. **Methods** PI gene fragments of *Neisseria gonorrhoeae* from 17 clinical isolates were obtained with PCR amplification. They were cloned into the PCR cloning vector pBS-T to form pBS-T-PI and sequenced. The sequences of PI genes were analyzed. At the same time, minimum inhibitory concentration (MIC) of penicillin and tetracycline to these 17 isolates were measured and contrasted with the corresponding PI sequence. **Results** The recombinants of PI gene from 17 clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* were successfully constructed and sequenced. They were divided into PIA and PIB subtypes according to the results from blastn software by comparing the sequences with the GenBank. Mutations were found at the sites of 120 and 121. There were only some of the sequences having an aspartic acid (D) mutation on 120 and 121 sites, which was not the same as reported. On the other hand, there were two PI sequences, 5-9 and 6-1, whose mutations on No. 120 were lysine, similar to those documented. **Conclusion** Some relationship between PI amino acids mutations at sites 120 and 121 in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Chengdu, China and their resistance to penicillin and tetracycline were found. However, further studies need to be done in the future to confirm this hypothesis.

【Key words】 *Neisseria gonorrhoeae*; Antibiotic resistance; PI gene; Sequence analysis

淋球菌仅感染人而不感染其他动物,因对人柱状上皮和移行上皮有特殊亲和力,容易侵犯泌尿生殖系统而导致女性宫颈炎和男性尿道炎等^[1],甚至造成不育症,且能增加 HIV 感染的几率^[2]。抗菌

治疗可以缩短感染持续的时间并减少淋病的传播,但近年来淋球菌的耐药性和耐药种类都不断增加,如何控制耐药性的产生和延展已成为防治淋球菌的首要问题。青霉素和四环素曾经是最常用的淋球菌治疗药物之一,但由于广泛的耐药性其应用已受局限。研究青霉素和四环素的耐药机理对控制淋球菌耐药性的继续蔓延非常重要,本文针对 PI 基因序列与淋球菌青霉素和四环素耐药性关系进行研究,试图探寻成都地区淋球菌临床分离株耐药性的机制,结果报道如下。

基金项目:四川大学科技创新基金资助项目(2004CF02)

作者单位:610031 成都,四川省医学科学院四川省人民医院皮肤病性病研究所(雍刚);四川大学华西公共卫生学院医检教研室(汪东篱、裴晓方、滕毅、沈圣、邱晋、谢志梅)

雍刚、汪东篱对本具有同等贡献

通讯作者:裴晓方, Email: xxpei@sina.com

材料与方 法

1. 实验菌株:淋球菌临床分离株共 17 株,由四川省医学科学院四川省人民医院皮肤病性病研究所自门诊淋病患者分泌物分离,经菌落特征、菌体形态及氧化酶试验初步鉴定,糖发酵试验确证后,分纯增菌,用 30% 甘油肉汤 - 70℃ 保存备用。质控菌株 WHO A、B、C、D 和 E 由中国医学科学院皮肤病研究所提供。大肠埃希菌 DH5 α 由四川大学华西公共卫生学院医检教研室提供。

2. 主要试剂和仪器:青霉素、四环素(中国医学科学院皮肤病研究所), T-M 培养基(英国 OXIOD 公司), PCR 引物 P1 (5'-ggg gga att ccc tga ttg ccc tga ctt tgg cag ccc ttc-3'), P2 (5'-ggg gct cga gtt gca acc agc cgg cag aaa cca agg c-3') (上海捷倍思基因技术有限公司合成), Taq plus DNA 聚合酶(上海生工生物工程技术有限公司), E. Z. N. A Cycle-Pure Kit (Omega Bio-Tek), pBS-T 平末端 DNA 片段克隆试剂盒(北京天为时代科技有限公司), UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司), IPTG (BBI), X-gal (Gold Bio Technology Inc), *EcoR* I、*Xho* I (MBI), DNA Marker IV (北京天为时代科技有限公司)等。PCR 扩增仪(Biometra Personal cycler), 紫外凝胶成像仪(UVItec Limited)。

3. 方法:①淋球菌青霉素及四环素耐药性测定:按文献[3]方法采用琼脂稀释法测定青霉素和四环素对淋球菌的最低抑菌浓度(MIC),培养基中抗生素的浓度范围为:青霉素 0.025~32 mg/L,四环素 2~32 mg/L。 β -内酰胺酶测定:按文献[3]采用纸片酸度定量法。②基因组提取和 *PI* 基因的扩增:取淋球菌单个菌落划线接种于 37℃ 预温的巧克力平板,37℃,5% CO₂,潮湿空气中培养 48 h,用 5 ml 生理盐水洗下菌苔,离心收集菌体沉淀,按 Lewington 等的方法经适当改良提取淋球菌基因组^[4]。用 Taq plus DNA 聚合酶扩增 *PI* 基因。PCR 扩增条件:95℃ 变性 1.5 min, 65℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 2 min,共 30 个循环。产物于 1.0% 琼脂糖凝胶,75 V 电泳 45 min,紫外凝胶成像仪观察。③PCR 产物纯化和 T-A 克隆:100 μ l PCR 产物用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化,40 μ l 灭菌超纯水抽提。纯化产物依次进行加 A 反应和加 A 产物与 pBS-T 载体的连接反应。如此得到连接产物后,取 10 μ l 转化冰

CaCl₂ 法制备的 DH5 α 感受态细胞,用含氨苄青霉素并涂布 IPTG 和 X-gal 的 LB 平板筛选阳性菌落。37℃ 培养 24 h 后,挑取平板上的白色菌落接种 LB 肉汤,37℃,220 r/min,培养 18 h,小量提取质粒,并用 *EcoR* I 和 *Xho* I 做双酶切,1.0% 琼脂糖凝胶,75 V 电泳 45 min,紫外凝胶成像仪观察并鉴定阳性重组子。④测序:由 Invitrogen 生物技术有限公司完成,使用 pBS-T 载体的通用引物,上游 5'-taa tac gac tca cta tag g-3',下游 5'-aat taa ccc tca cta aag gg-3',用 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit with AmpliTaq DNA Polymerase, FS (Applied Biosystems) 作为反应试剂,ABI PRISM™ 377XL DNA Sequencer 对重组 *PI* 基因序列进行测序。⑤序列分析:将所得序列提交 blastn 在线序列搜索软件,在 GenBank 数据库中搜索相似序列;用在线序列分析软件 The Sequence Manipulation Suite 将 DNA 序列转化为氨基酸序列;用 DNAssist 软件对氨基酸序列做多序列同源性比较。

结 果

1. 耐药性测定:MIC 试验结果表明,所得 17 株淋球菌均对青霉素和四环素耐药,2-9、5-9、6-1 及 B5-34 不产生 β -内酰胺酶。结果见表 1。

2. 克隆与测序:淋球菌 *PI* 基因 T-A 克隆重组子经双酶切,均得到 3.0 kb 及约 1.0 kb 2 条电泳条带,初步鉴定为阳性克隆,见图 1、2 (由于菌株较多,仅分别以 2-9 和 1-14 为例,其余菌株克隆情况与之类似)。经测序,目的基因序列从长短上分为两类,一类全长 907 碱基,共 7 条;另一类全长 970 碱基,共 10 条。

3. 序列分析:

(1)BLAST 分析:将所得序列提交 NCBI 网站在线序列搜索软件 blastn,在 GenBank 数据库中搜索所得序列的相似序列,结果发现,全长 907 bp 的序列与 GenBank 数据库中淋球菌外膜蛋白 PIA 序列同源性最高,而全长 970 bp 的序列则与淋球菌外膜蛋白 PIB 序列同源性最高。另已知 PIB 序列长于 PIA,因此可认为,全长 907 bp 的序列属于淋球菌外膜蛋白 PIA 亚型,全长 970 bp 的序列属于淋球菌外膜蛋白 PIB 亚型。分型结果见表 1。

(2)耐药性位点序列分析:比较所得 17 条 *PI* 基因序列第 120、121 位的氨基酸残基,PIA 亚型 7

条序列在 120、121 位均为 DG(即天冬氨酸 D 和甘氨酸 G),PIB 亚型除 2-7 为 KN(赖氨酸 K 和天冬酰胺 N),7-2 为 DG,7-10、A611 为 DA(天冬氨酸 D 和丙氨酸 A)外,其余均为 KD(赖氨酸 K 和天冬氨酸 D),见表 1。

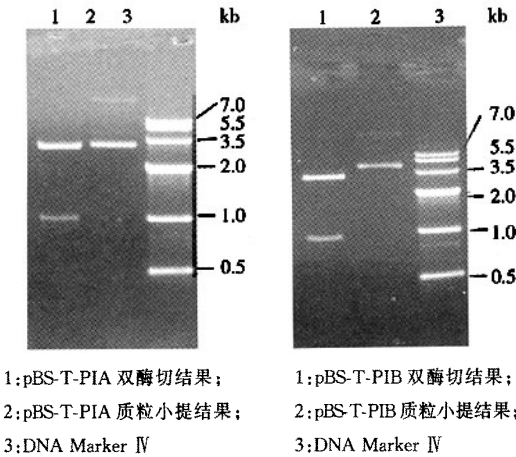
表1 17 株淋球菌对青霉素和四环素的 MIC^a 及其外膜蛋白 PI 120、121 位氨基酸序列

菌株号	MIC($\mu\text{g/ml}$)		β -内酰胺酶	PI 亚型	120、121 位序列
	青霉素	四环素			
1-14	>32	>32	+	PIB	KD
2-7	>32	4	+	PIB	KN
2-9	32	>32	-	PIA	DG
5-9	2	4	-	PIB	KD
6-1	2	2	-	PIB	KD
7-2	8	4	+	PIB	DG
7-10	>32	4	+	PIB	DA
9-13	>32	4	+	PIA	DG
A67	>8	<8	+	PIB	KD
A611	>8	>16	+	PIB	DA
A7-31	>8	<8	+	PIA	DG
A7-32	>8	<8	+	PIA	DG
A7-33	>8	>16	+	PIA	DG
B3-10	>8	>16	+	PIB	KD
B5-42	>8	<8	+	PIB	KD
B5-33	>8	<8	+	PIA	DG
B5-34	>8	<8	-	PIA	DG

^a MIC>1 $\mu\text{g/ml}$ 视为耐药

基于 TEM-1 样 β -内酰胺酶的产生,而四环素抗性则由 TetM 决定。染色体介导的青霉素和四环素抗性则由多个耐药基因产生,包括 *penA*、*mtr* 及 *penB*。其中 *penB* 可同时介导青霉素和四环素抗性的增加。*penB* 基因与淋球菌外膜蛋白 PI 的编码基因 *por* 在基因组中紧密相连,1998 年 Gill 等^[6]发现,淋球菌 *penB* 基因导致的青霉素和四环素耐药性与该基因相邻位点的 *por* 基因 loop 3 段序列的变异性有相关关系。随后 Melanie 等^[5]用基因重组的方法,对 *por* IB 基因的变异位点与 *penB* 基因导致的耐药性改变进行了深入研究,发现 PIB 有 2 个氨基酸突变,即 120 位的甘氨酸 G 到天冬氨酸 D 突变和 121 位的丙氨酸 A 到天冬氨酸 D 突变,在 *penB* 导致的青霉素和四环素耐药性中起重要作用。他们比较 GenBank 数据库中的序列后发现,这种 120 和(或)121 位的突变在临床分离株中也是常见的。我国临床分离株的类似研究未见报道。本文对淋球菌临床分离株 PI 基因序列进行了克隆与序列分析,结果表明,所得的 17 条 PI 基因未见 120 和 121 位双突变的序列,大部分仅有其中一个位点发生上述变异。将序列分析结果与 MIC 结果比较可见,120 和 121 位序列相同的菌株 MIC 也有不同,其原因可能在于淋球菌存在多种耐药机制。

Melanie 等还发现,120 和(或)121 位若为带电氨基酸,如赖氨酸(K)、精氨酸(R)等,也能介导中等程度的青霉素和四环素耐药^[6]。本研究所得序列中,有 7 条序列的 120 位为赖氨酸 K,根据 Melanie 等的理论耐药性应处于中等耐药水平,但 MIC 实验结果发现 7 个菌株间耐药性差别较大,并不能验证该理论。究其原因,应为耐药机理不同所致。淋球菌的耐药机制包括质粒介导和染色体介导的耐药性。质粒介导的耐药性通常较强,而染色体介导的耐药性一般处于中等水平。质粒介导的青霉素耐药株多产生 β -内酰胺酶,据此可初步推断青霉素的耐药机制。研究所得菌株的 β -内酰胺酶产生情况,除 2-9、5-9、6-1、B5-34 外,其余均为 β -内酰胺酶阳性,可认为大部分菌株的青霉素耐药性主要由质粒引起。 β -内酰胺酶阴性的 4 株菌中,5-9、6-1 两株 PIB 型菌的青霉素和四环素耐药性均处于中等水平,其 120 位均为赖氨酸 K,与 Melanie 等的实验结果相符。说明在成都地区淋球菌临床分离株的 PIB 序列中存在影响青霉素和四环素耐药性的氨基酸残基突变,但由于样本量较小,因此在此后的研究中应增大



1: pBS-T-PIA 双酶切结果;
2: pBS-T-PIA 质粒小提结果;
3: DNA Marker IV
图1 pBS-T-PIA 质粒双酶切结果(以菌株 2-9 为例)

1: pBS-T-PIB 双酶切结果;
2: pBS-T-PIB 质粒小提结果;
3: DNA Marker IV
图2 pBS-T-PIB 双酶切结果(以菌株 1-14 为例)

讨 论

针对淋球菌耐药机理的研究已有不少报道^[5],如淋球菌抗青霉素和四环素的机制可能由质粒介导,也可能由染色体介导。质粒介导的青霉素抗性

调查范围,以确证该结论。

淋球菌外膜蛋白 PI 是一个环形筒状跨膜离子通道,运输离子及小分子物质进出细胞^[7]。PI 由 8 个跨膜的 loop 环状结构组成,PI 的抗原决定簇主要集中于这些暴露于膜外的 loop 区域^[8]。本文所研究的 PIB 蛋白第 120 和 121 位氨基酸位于 PI 的第 3 个 loop 结构,loop 3 位于 PI 单体孔道中央,与 PI 的功能密切相关。120 和 121 位氨基酸残基的突变可能使 loop3 的结构发生改变,从而减少抗生素进入胞浆的数量,增强细菌的耐药性。该机制尚未经过试验论证,在今后的研究中有待证实。

综上所述,本文研究了成都地区淋球菌临床分离株 PI 基因序列与耐药性的关系,发现其中 2 株由染色体介导的耐药菌株在 PI 基因第 120 位有赖氨酸的突变,其结果与 Melanie 等的研究相符,说明 PI 基因与淋球菌染色体介导的耐药性可能相关。该结论及其机理尚有待进一步论证。

参 考 文 献

[1] 蔡桂茹.女性传播疾病——淋病. 武汉医学杂志, 1994, 18: 172-174.

- [2] Milan SB, Lee MW. Vaccines for gonorrhoeae; where are we on the curve? Trends in Microbiology, 1995, 3:469-475.
- [3] 叶顺章.性传播疾病的实验室诊断. 北京:科学出版社, 2001: 53-56.
- [4] Susan JC, Helen de la Paz, Chit LP, et al. Variation within serovars of *Neisseria gonorrhoeae* detected by structural analysis of outer-membrane protein PIB and by pulsed-field gel electrophoresis. Microbiology, 1997, 143:1415-1422.
- [5] Melanie O, Marcia H, Robert AN. Identification and analysis of amino acid mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46:2811-2820.
- [6] Gill MJ, Simjee S, AL-Hattawi K, et al. Gonococcal resistance to beta-lactams and tetracycline involves mutation in loop 3 of the porin encoded at the *penB* locus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, 42:2799-2803.
- [7] Peter Van Der Ley, John EH, Mumtaz V, et al. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. Infection and Immunity, 1991, 59:2963-2971.
- [8] Jeremy PD, Rachel U, Janet S, et al. Structural and evolutionary inference from molecular variation in *Neisseria* porins. Infection and Immunity, 1999, 67:2406-2413.

(收稿日期:2006-05-19)

(本文编辑:王多春)

· 有错即改 ·

作者对本刊 2003 年第 10 期“四川省恶性淋巴瘤发病与环境因素的病例对照研究”一文的勘误

本刊 2003 年第 24 卷第 10 期 875~878 页刊登了徐才刚等撰写的论文,现作者勘误如下:

1. 中文“摘要”中第 3 行的苯调整 OR (*aOR*) 值 = 3.78 (原为 2.78); 第 4 行香蕉水 *aOR* 值 = 2.98 (原为 2.28)、有机磷类 *aOR* 值 = 7.98 (原为 1.98); 第 7 行饲养宠物狗 *aOR* 值 = 7.76 (原为 1.76); 第 10 行饮酒 *aOR* 值 = 1.01 (原为 1.26)。英文“摘要”中第 5 行 benzene *aOR* = 3.78 (原为 2.78)、banana oil *aOR* = 2.98 (原为 2.28); 第 6 行 organic phosphorus *aOR* = 7.98 (原为 1.98); 第 8 行 dog-raising *aOR* = 7.76 (原为 1.76)。

2. “结果”部分:①表 1 的 OR 值(95% CI) 一列的第 3 行 OR 值应为 2.47 (原为 2.41); 第 4 行 95% CI 应为 2.09~7.30 (原为 2.90~7.30); 第 5 行 OR 值应为 7.98 (原为 1.98); 第 7 行 OR 值应为 5.52 (原为 2.55); 第 8 行 OR 值应为 2.84 (原为 2.54); 第 9 行 OR 值应为 1.67 (原为 1.87)。②表 2 的 OR 值(95% CI) 一列的第 1 行 OR 值应为 1.07 (原为 1.67); 第 5 行 OR 值应为 2.75 (原为 2.15), 95% CI 应为 2.09~7.24 (原为 2.99~7.24); 第 6 行 OR 应为 1.17 (原为 1.11)。③表 3 的 OR 值(95% CI) 一列的第 6 行 OR 值应为 11.82 (原为 1.82); 第 7 行 OR 值应为 1.67 (原为 1.61)。④表 4 的 *aOR* 值(95% CI) 一列的第 1 行:苯的 *aOR* 值应为 3.78 (原为 2.78), 阿司匹林的 95% CI 应为 2.13~8.44 (原为 2.43~8.44); 第 3 行:香蕉水的 *aOR* 值应为 2.98 (原为 2.28); 第 4 行:油漆的 95% CI 应为 1.72~7.36 (原为 2.12~7.36); 第 5 行:有机磷农药的 *aOR* 值应为 7.98 (原为 1.98), 养狗的 *aOR* 值应为 7.76 (原为 1.76); 第 7 行:有机氮农药的 95% CI 应为 2.17~13.36 (原为 2.67~13.36)。⑤在“结果”2. 单因素分析中的第(5)社会经济因素与淋巴瘤的关系条目下,在“而同事关系紧张”之前应加上“内向性格 (OR = 1.26, P = 0.266)”。

为此本刊编辑部谨代表作者向读者深表歉意。

本刊编辑部