论文

抑制 *E. coli* 的 SOS 应答对恩诺沙星抗药性的影响王进文^{①②}, 胡明^{①②}, 白华^{①②}, 颜世敢^{①②}, 李璐璐^{①②}, 骆延波^{①②}, 齐静^{①②},
韩哲^③, 刘玉庆^{①②*}

① 山东大学农学院, 济南 250101;

② 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 济南 250101;

③ 山东省科学院新材料研究所, 济南 250014

* 联系人, E-mail: liuiqing@126.com

收稿日期: 2014-11-11; 接受日期: 2014-12-31

国家自然科学基金(批准号: 81271886)、山东省科技攻关计划(批准号: 2012GGC02012)、山东省自然科学基金青年基金(批准号: ZR2013CQ037)、国家科技重大专项(批准号: 2013ZX10004217-003)和山东省农业重大应用技术创新课题资助
doi: 10.1360/N052014-00280

摘要 通过敲除 SOS 应答启动蛋白基因 *recA*, 探讨 SOS 应答对 *E. coli* 恩诺沙星抗药性的影响, 并体外评价 RecA 抑制剂和恩诺沙星联用对细菌协同抑制作用的影响. 利用 Red 重组系统, 构建 *E. coli* ATCC 25922 的 *recA* 缺失菌株 *E. coli* ATCC 25922/ $\Delta recA$; 在恩诺沙星压力下, 利用荧光定量 PCR 测定 SOS 应答系统相关基因 *recA* 和 *umuC* 表达量的变化. 用微量肉汤稀释法测定恩诺沙星等常用抗生素对两个菌株的 MIC 变化; 利用梯度平板法测定恩诺沙星对两个菌株抗药性变异的影响; 合成 RecA 抑制剂, 并评估其与恩诺沙星联合抑制 *E. coli* 生长及其抗药性的作用. 结果表明, *E. coli* ATCC 25922/ $\Delta recA$ 菌株对恩诺沙星的最低抑菌浓度值降低至原始菌株的 1/8; 经药物处理后, 在梯度平板上, *recA* 缺失菌株较野生型不易产生抗药性; 荧光定量 PCR 表明, *recA* 缺失菌株或在 RecA 抑制剂作用下, SOS 应答系统受到一定的抑制. 敲除 *recA*, 使菌株对恩诺沙星的抗药性和抗药率均明显降低; RecA 抑制剂在一定程度上能抑制 SOS 应答, 起到协同抑菌作用.

关键词

E. coli
SOS 应答
recA
恩诺沙星
抗药性
RecA 抑制剂

长期的生物进化, 使细菌形成较为稳定的物种的多样性和对其生存环境适应机制的多样性, 但是, 剧烈的环境变化, 如接触高剂量的抗生素, 则会诱导细菌的各种生理调控机制、突变机制, 甚至促使细菌间通过质粒传递抗药性基因, 形成对该种抗生素的高度适应^[1,2]. 目前, 大部分抗药性研究集中于终端菌株样本的抗药性表型检测和静态的遗传生化机制分析, 而在目前频繁使用抗生素的状况下, 对细菌抗

药性调控机制研究, 无论是理论上还是医疗应用上都有迫切需要.

在细菌的各种调控系统中, 细菌的 SOS 应答系统从整体上对细菌许多重要细胞功能具有调控作用, 包括修复单链 DNA(ssDNA)损伤及促进其突变和优选、对被调控基因的表达量调节、调控细胞分裂、促进基因水平转移以及细胞的程序性死亡等^[3-5]. SOS 应答受启动蛋白 RecA 和抑制蛋白 LexA 的正负调控,

引用格式: 王进文, 胡明, 白华, 等. 抑制 *E. coli* 的 SOS 应答对恩诺沙星抗药性的影响. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 498–506Wang J W, Hu M, Bai H, et al. Effect of SOS response inhibition on enrofloxacin resistance in *Escherichia coli*. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 498–506, doi: 10.1360/N052014-00280

喹诺酮类抗生素导致 ssDNA 在细胞内聚积, RecA 与 ssDNA 形成核酸蛋白复合物, 介导 LexA 二聚体在 Ala⁸⁴-Gly⁸⁵ 位点上的裂解^[6,7], 并从 SOS 应答控制基因的 SOS box 脱落, 这样 RNA 聚合酶结合到 SOS box, SOS 应答控制的基因获得表达. 喹诺酮类抗生素的靶蛋白基因 *gyrA* 和 *griA* 突变导致的抗药性, 是研究 SOS 应答效应的典型, 这类突变不易回复敏感, 使这一大类抗生素的疗效受到重大影响^[8]. 人们一直期望重复“ β -内酰胺+内酰胺酶抑制剂”那样高效的组合效应^[9], 保障菌株对喹诺酮的敏感性.

通过敲除 *recA* 基因、突变 *lexA* 基因等方式抑制 SOS 应答^[10,11], 证明了通过抑制 SOS 应答来减缓抗药性提高的可行性. 但临床上更为实用的方法是筛选 SOS 抑制剂. RecA-DNA 核蛋白的形成过程依赖于 ATP, Sexton 等人^[12]从 35000 个 ATP 酶活性抑制剂中筛选出 33600 种组分, 其中已验证的 40 种抑制剂可分为 4 种化学型, 而 N⁶-(1-naphthyl)-ADP 是 ATP 酶结合力最高的化合物.

通过 Red 重组系统敲除 *Escherichia coli* ATCC 25922 菌株的 SOS 应答的启动蛋白基因 *recA*^[13], 构建抑制 SOS 系统的菌株模型作为对照; RecA 抑制剂和恩诺沙星(enrofloxacin, EN)共同作用于 *E. coli*, 通过抗药性程度、抗药率变化和联合抑菌试验本评价 RecA 抑制剂的实际效果.

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 菌株与质粒. *E. coli* ATCC 25922 菌株(由本实验室保存); Red 重组系统包括 3 种质粒: pKD46, pKD3 和 pCP20(购自耶鲁大学菌种保藏中心).

(2) 培养基与试剂. LB(Luria-Bertani), MHB

(Mueller-Hinton broth)和 MHA(Mueller-Hinton agar)培养基购自北京陆桥技术有限责任公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; Taq DNA 聚合酶, PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser 和 SYBR premix EX Taq II 购自 TaKaRa 公司(日本); 恩诺沙星等抗生素购自 Sigma 公司(美国).

(3) PCR 引物(表 1)由上海生工生物有限公司合成.

1.2 方法

(1) *E. coli* ATCC 25922 中 *recA* 基因的敲除. 将质粒 pKD46 电转化入 *E. coli* ATCC 25922 感受态细胞, 利用氨苄青霉素抗性筛选 *E. coli* ATCC 25922/pKD46 单克隆, 用 L-(+)-arabinose(终浓度为 2 mmol/L)诱导使 Exo, Bet 和 Gam 蛋白充分表达.

以 pKD3 为模板, 利用引物 *recA*-F 和 *recA*-R 扩增 *recA* 基因上下游序列作为同源臂及两侧带有 FRT(flipase recombination target)序列的氯霉素抗性基因的基因敲除片段. PCR 产物纯化后电转入上述表达重组酶的 *E. coli* ATCC 25922/pKD46 感受态细胞, 用氯霉素抗性筛选阳性克隆. 提取其 DNA 作为模板, 用验证引物 Cam-5F 和 *recA*-3R 进行 PCR, 验证 *recA* 基因是否被替换成氯霉素抗性基因, 获得 *E. coli* ATCC 25922 Δ *recA*/pKD46/Cam 菌株.

将上述菌株在 42℃ 培养传代 3 次, 分别接种于氯霉素或氨苄青霉素抗性平板, 挑选 pKD46 已丢失的菌株 *E. coli* ATCC 25922 Δ *recA*/Cam. 然后向该菌株中电转入质粒 pCP20, 在氨苄青霉素抗性平板上 30℃ 培养至单克隆形成, 即为 *E. coli* ATCC 25922 Δ *recA*/Cam/pCP20. 将该菌株热诱导翻转重组酶表达, 同时质粒逐渐丢失, 在无抗生素培养基上划线培养,

表 1 PCR 引物序列

引物	序列(5'→3')	功能
<i>recA</i> -F	CAACAGAACATATTGACTATCCGGTATTACCCGGCATGAC	合成打靶序列
<i>recA</i> -R	AGGAGTAAAACATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTC GGGCCGCAGATGCGACCCTTGTTGATCAAACAAGACGAT TAAAAATCTTCGAGCTGCTTCGAAGTTCCTA	
<i>recA</i> -5F	GCTGATTATGCCGTGTCTATTAGTG	合成完整的 <i>recA</i> 基因序列(含 <i>recA</i> 上下游基因的部分序列)
<i>recA</i> -3R	GAGATAGCCATGTTTCATGGCAG	
Cam-5F	CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTC	与 <i>recA</i> -3R 合成 Cam 基因

选取单菌落接种于氯霉素抗性平板上, 未生长的为氯霉素抗性基因, 已被翻转酶重组酶删除. 提取细菌基因组 DNA, 利用引物 *recA*-5F 和 *recA*-3R 进行 PCR, 确定氯霉素抗性基因删除后, 即获得 *E. coli* ATCC 25922/ $\Delta recA$.

(2) N^6 -(1-naphthyl)-ADP 抑制剂的合成与鉴定. 美国国立卫生研究院资助从 33600 种化合物中筛选出与 *RecA* ATPase 结合抑制作用较强的 4 类化合物. 其中, 2-(4-(5-乙基呋喃)-6-(2,2,6,6-四甲基哌啶-4-氨基))吡啶基-4-甲基苯酚与 *RecA* ATPase 的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})为 $4.7 \mu\text{m}$ ^[12].

目标化合物按照以下合成路线(图 1)合成, 并用 AVANCE 600 MHz 核磁共振波谱仪(Bruker, 瑞士)测定合成化合物的 ^1H NMR 谱进行鉴定, 溶剂为氘代氯仿 CDCl_3 .

(3) *RecA* 抑制剂与恩诺沙星的联合抑菌作用. 恩诺沙星的浓度按照 0, 0.002, 0.004, 0.008, 0.016 和 $0.032 \mu\text{g/mL}$ 设置, *RecA* 抑制剂的浓度为 61.194, 50.995, 40.796, 30.597, 25.4975, 20.398, 15.2985, 10.199, 5.0995, 2.0398 和 $0 \mu\text{g/mL}$, 进行棋盘试验, 每个微孔中细菌的接种量为 10^5 CFU/mL, 菌液和药物加入到 Bioscreen 生长曲线自动分析仪的 100 孔培养

板中, 37°C 培养, 每隔 15 min 测定细菌 A_{600} , 持续 48 h, 绘制 *E. coli* ATCC 25922 和 25922/ $\Delta recA$ 的生长曲线. 测试至少重复 3 次, 变异系数(coefficient of variation, CV)小于 5%.

(4) *recA* 缺失对恩诺沙星等抗生素的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)及抗药性变异的影响. 根据临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准^[14], 用微量肉汤稀释法测定 *E. coli* ATCC 25922 和 25922/ $\Delta recA$ 对恩诺沙星、头孢噻肟钠、头孢曲松、氟苯尼考、氨苄西林、左氧氟沙星、丁胺卡那、庆大霉素、强力霉素、硫酸黏菌素和磷霉素的最低抑菌浓度.

根据微量肉汤稀释法菌株对恩诺沙星 MIC 的结果, 配制含恩诺沙星(相应菌株的 4 MIC)的 MHA 20 mL 制作梯度平板的底层, 倾斜一定角度使其刚好完全覆盖培养皿底面, 待充分凝固后平置, 于底层上面倾注 20 mL MHA 无药物培养基. 12 h 后, 恩诺沙星在固体平板中扩散形成连续的线性梯度. 用 *E. coli* ATCC 25922 和 25922/ $\Delta recA$ 各自 1/2 MIC 的恩诺沙星, 分别处理菌株 12 h, 然后以 10^8 CFU/mL 浓度涂布梯度平板. 对照为未经药物处理的菌悬液. 在药物坡面平板上, 菌群在其 MIC 浓度以下的区域形成菌苔, 同时形成清晰的边缘线, 为准确的 MIC; 边缘线以上形成具有抗药性表型的离散菌落, 据此, 可以精准测定 MIC 和抗药性变异潜力^[15].

(5) 荧光定量 PCR 测定 SOS 应答系统相关基因 *recA* 和 *umuC* 表达量的变化. 用 1/2 MIC 浓度的恩诺沙星处理 *E. coli* ATCC 25922, 分别在 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 h 用荧光定量 PCR 测定 *recA* 和 *umuC* 表达量的变化. 相对荧光定量 PCR 的内参基因是 *rpoB*, 其在本文的任何条件下表达量都不受影响. 所使用的仪器是罗氏 LightCycler® 480 II(瑞士). 每个样品重复 3 次.

根据上述试验结果, 选择 *umuC* 表达量最大的时间点, 分别测定不同条件菌株中 *umuC* 基因的表达变化. 菌株及处理条件如下: (i) *E. coli* ATCC 25922 无药物处理; (ii) *E. coli* ATCC 25922 用其 1/2 MIC 恩诺沙星处理; (iii) *E. coli* ATCC 25922 用其 1/2 MIC 恩诺沙星处理及 *RecA* 抑制剂($15.2985 \mu\text{g/mL}$)联合作用处理; (iv) *E. coli* ATCC 25922/ $\Delta recA$ 用其 1/2 MIC 恩诺沙星处理; (v) *E. coli* ATCC 25922/ $\Delta recA$ 无药物处理.

图 1 N^6 -(1-naphthyl)-ADP 的合成路线

2 结果与分析

2.1 *recA* 基因敲除的鉴定

利用引物 Cam-5F 和 *recA*-3R 进行 PCR 验证, 4 个 *E. coli* ATCC 25922/pKD46/cat 阳性克隆中有 2 个(图 2A, 条带 3 和 4)均可以扩增到 1291 bp 的条带, 表明 *E. coli* ATCC 25922/pKD46/cat 菌株染色体上 *recA* 基因已被替换成氯霉素抗性基因。

利用引物 *recA*-5F 和 *recA*-3R 对 *E. coli* ATCC 25922 的 *recA* 基因敲除菌株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增并测序, 4 个 *recA* 基因敲除菌株(图 2B, 条带 1, 2, 3 和 4)均扩增得到 698 bp 的条带, 测序结果比对未发现 *recA* 基因序列, 表明这 4 个菌株基因组上的氯霉素抗性基因已被成功敲除, 命名为 *E. coli* ATCC 25922/ Δ *recA*。

2.2 *RecA* 抑制剂 N^6 -(1-naphthyl)-ADP 的核磁共振鉴定

经核磁共振氢谱验证, 合成化合物为 2-(4-(5-乙基呋喃)-6-(2,2,6,6-四甲基哌啶-4-氨基))吡啶基-4-甲基苯酚(图 3), ^1H NMR(600 MHz, CDCl_3) 如下: 0.96~1.02(t, 3H), 1.16(s, 6H), 1.29~1.32(t, 3H), 1.36(s, 6H), 2.07~2.11(dd, 2H), 2.34(s, 3H), 2.74~2.75(q, 2H), 4.09~4.13(m, 1H), 4.31~4.33(d, 1H), 6.13~6.14(d, 1H), 6.54~6.55(d, 1H), 6.78~6.79(d, 1H), 6.86~6.88(d, 1H), 7.06~7.08(q, 1H), 7.34(s, 1H), 7.6(d, 1H)。

2.3 恩诺沙星与抑制剂联合抑菌作用

通过不同浓度的恩诺沙星与抑制剂的联合抑菌曲线(图 4)可以看出, *E. coli* ATCC 25922/ Δ *recA* 生长

曲线显著低于原始菌株, 并大幅度后移。随着恩诺沙星浓度提高, 菌株生长迅速被完全抑制, 表明敲除 *recA* 基因显著影响 *E. coli* 的活性, 是可靠的阳性对照; 随着恩诺沙星浓度提高, 各浓度生长曲线整体下移, 最终完全抑制, 0.016 $\mu\text{g/mL}$ 可以认为是恩诺沙星的 MIC; 抑制剂也有显著的抑菌作用, 在无恩诺沙星作用时, 50.995 $\mu\text{g/mL}$ 以上的抑制剂能完全抑制 *E. coli* 生长; 与 0.016 $\mu\text{g/mL}$ 恩诺沙星联合使用, 仅需要 10.199 $\mu\text{g/mL}$ 以上的抑制剂就能完全抑制 *E. coli* 生长。

通过不同药物浓度组合下菌株的生长曲线, 判定“0.016 $\mu\text{g/mL}$ 恩诺沙星+50.995 $\mu\text{g/mL}$ 抑制剂”以上的组合, 不管单独还是联合都能完成抑制 *E. coli* 生长, 并且持续抑制; “0.004 $\mu\text{g/mL}$ 恩诺沙星+20.398 $\mu\text{g/mL}$ 抑制剂”以下的组合均不能抑制 *E. coli*, 最终达到 A_{600} 为 0.6 值以上(表 2)。在这 2 个组合之间, 有一定程度的联合抑制作用, 具有浓度和时间的依赖性。

2.4 *E. coli* ATCC 25922/ Δ *recA* 对恩诺沙星等抗生素的 MIC 及抗药性变异的影响

微量肉汤稀释法测定不同抗生素 MIC 的结果表明(表 3), *E. coli* ATCC 25922/ Δ *recA* 对恩诺沙星的 MIC 值为 0.0019525 $\mu\text{g/mL}$, 明显低于野生型菌株 0.015625 $\mu\text{g/mL}$, 降低至原来的 1/8; 同时此基因缺失株对其他多种抗生素的 MIC 也显著降低, 幅度在 2~8 倍。这些抗生素抑菌杀菌机理不尽相同, 但 *recA* 基因缺失对细菌 MIC 均有不同程度的影响, 表明此基因广泛影响细菌的生理生化过程, 减少了细菌的耐药性。

图 2 同源重组菌株 *E. coli* ATCC 25922/pKD46/cat 和 *recA* 基因敲除菌株 *E. coli* ATCC 25922/ Δ *recA* 的 PCR 鉴定

A: 氯霉素抗性基因; B: *recA* 基因敲除; M: DNA marker; 泳道 1~4: 阳性菌株

图3 N^6 -(1-naphthyl)-ADP 抑制剂的核磁共振氢谱

梯度平板法能够给出连续的药物浓度,测定更确切的 MIC,并进一步显示菌群在梯度药物作用下的抗药性表型.如图5所示,用 $1/2$ MIC 浓度的恩诺沙星处理 *E. coli* ATCC 25922 12 h 后,在坡面平板上,高于 MIC 浓度的区域形成的离散抗药性菌落较未经药物处理的菌群显著增加;而菌株 25922/ ΔrecA 不管是否经过恩诺沙星处理,所形成的离散菌落数明显少于野生型菌株,说明 *recA* 基因缺失后,菌株不易产生抗药性.

2.5 荧光定量 PCR 测定 SOS 应答系统相关基因 *recA* 和 *umuC* 表达量的变化

recA 基因编码 SOS 应答的启动蛋白 RecA, *recA* 基因的表达量可以反映 SOS 应答启动与否. *umuDC* 操纵子是 SOS 应答系统组分之一,编码 *E. coli* 聚合酶 V,其主要功能是修复 DNA 损伤,同时易引起基因突变,突变率大概在 10^{-4} ~ 10^{-3} . 细胞中聚合酶 V 的量由 *umuC* 基因表达水平决定. *recA* 基因的缺失抑制

SOS 系统的启动,可能影响 *umuC* 基因的表达,从而引起菌株突变率的变化.

通过荧光定量 PCR 测定 *E. coli* ATCC 25922 中 *recA* 和 *umuC* 表达量的变化(图6)发现,在恩诺沙星压力下, *recA* 表达量上调,显著高于本底水平,表明此条件下, *E. coli* 中 SOS 应答系统启动,并且在处理 4.5 h 左右达到峰值.同时发现,相同条件下,下游基因 *umuC* 表达量也有所升高,并且在处理 7 h 左右达到峰值,与 *recA* 表达有一定的时间差.

从图7可以看到,相对于未经药物处理的野生型对照(A), *E. coli* ATCC 25922/ ΔrecA 中(E) *umuC* 表达量降低 1 倍左右,但二者均处于较低的表达水平;当原始菌株用 $1/2$ MIC 恩诺沙星处理(B), *umuC* 的表达量显著增高,而 *umuC* 表达量的升高可能与突变率的变化有关. RecA 抑制剂与恩诺沙星联合使用时(C), *umuC* 的表达量为恩诺沙星单独处理时 *umuC* 表达量的 $1/2$ 左右,说明恩诺沙星处理能够导致 *umuC* 表达量升高,而 RecA 抑制剂能部分消除这种作用,与

图 4 恩诺沙星和抑制剂(μg/mL)联合抑菌曲线

表 2 联合药敏试验(μg/mL)^{a)}

恩诺沙星抑制剂	0.032	0.016	0.008	0.004	0.002	0
61.1940	—	—	—	—	—	—
50.9950	—	—	—	—	—	—
40.7960	—	—	—	—	*	*
30.5970	—	—	*	*	*	*
25.4975	—	—	*	*	*	+
20.3980	—	—	*	*	+	+
15.2985	—	—	*	+	+	+
10.1990	—	—	*	+	+	+
5.0995	—	—	+	+	+	+
2.0398	—	—	+	+	+	+
0	—	—	+	+	+	+

a) —: 此药物浓度下菌株未生长; *: 此药物浓度下, 对细菌有抑菌作用, 在第 2 天细菌开始生长; +: 此药物浓度下, 菌株能较为正常的生长

表 3 *E. coli* ATCC 25922 和 25922/ Δ *recA* 对 11 种抗生素的 MIC(μ g/mL)

药物	ATCC 25922	ATCC 25922/ Δ <i>recA</i>	MIC 降低倍数
恩诺沙星	0.015625	0.0019525	8
头孢噻肟钠	0.03125	0.015625	2
头孢曲松	0.03125	0.015625	2
氟苯尼考	2	0.25	8
氨苄西林	2	0.5	4
左氧氟沙星	0.0078	0.0019525	4
丁胺卡那	1	0.5	2
庆大霉素	1	0.125	8
强力霉素	0.5	0.125	4
硫酸黏菌素	1	0.25	4
磷霉素	2	0.5	4

图 5 梯度平板法检测 *E. coli* 抗药性变异

A: *E. coli* ATCC 25922; B: *E. coli* ATCC 25922 经 1/2 MIC 的恩诺沙星处理 12 h; C: *E. coli* ATCC 25922/ Δ *recA*; D: *E. coli* ATCC 25922/ Δ *recA* 经 1/2 MIC 的恩诺沙星处理 12 h

RecA 抑制剂抑制了 SOS 系统的启动有关. 25922/ Δ *recA* 菌株在恩诺沙星诱导条件下(D), *umuC* 表达量也有所升高, 但上调幅度低于对照组, 说明 *recA* 基因的缺失部分抑制 *umuC* 表达量的提高.

3 讨论

喹诺酮类药物是第一种全合成的抗菌药物, 主要靶位是 DNA 复制的关键酶^[16], 曾被认为是不会产生抗药性的一劳永逸的抗菌药物. 然而, 它的靶位

图 6 1/2 MIC 的恩诺沙星压力下 *recA* 和 *umuC* 基因的相对表达量

图 7 不同条件下 *umuC* 基因相对表达量的变化

A: *E. coli* ATCC 25922 无药物处理; B: *E. coli* ATCC 25922 用其 1/2 MIC 恩诺沙星处理 7 h; C: *E. coli* ATCC 25922 用其 1/2 MIC 恩诺沙星及 *RecA* 抑制剂(15.2985 μ g/mL)联合作用处理 7 h; D: *E. coli* ATCC 25922/ Δ *recA* 用其 1/2 MIC 恩诺沙星处理 7 h; E: *E. coli* ATCC 25922/ Δ *recA* 无药物处理

蛋白却恰恰最容易发生基因突变, 并成为 SOS 的主要研究模型^[8].

SOS 应答是大肠杆菌的一种全局性调控系统, 受 *RecA*-LexA 蛋白的双向调节, 调控 40~60 个重要基因, 约占大肠杆菌总基因的 0.93%~1.58%^[17,18], 这些被调控的基因分布在大肠杆菌染色体的不同部位, 功能涉及基因突变^[10,11]、基因重组^[19]、基因水平转移^[20]、基因的表达水平^[21]等方面, 使细菌显示抗药性表型. 这提供了一个分析抗药性及其调控机制的新视角. 毫无疑问, 抑制 *RecA* 将极大地干扰细菌的 SOS 应答及其调控的基因的表达, 减弱细菌的生长和应激反应, 相应地, 增强抗生素的抗菌活性. 尽管

与“ β 内酰胺+ β 内酰胺酶抑制剂”组合的原理不同,但是仍然激发人们研发新抑制剂的兴趣^[12,22,23]。*recA* 基因的缺失对 *E. coli* 的影响是显著的,使对多种抗生素的 MIC 显著降低,并且药物坡面平板的结果表明,*recA* 缺失菌株不管是否经过抗生素处理,形成具有抗药性的离散菌落数明显少于野生型菌株,说明 *recA* 缺失菌株不易产生抗药性。

美国国立卫生研究院资助 10 年筛选出 33600 种 *RecA* 抑制剂,已确定的 40 种化合物,分为 4 类化学型,其中 N^6 -(1-naphthyl)-ADP 是 ATP 酶结合力最高的化合物, $IC_{50}=4.7 \mu\text{mol/L}=2.0398 \mu\text{g/mL}$ 。本实验合成了该化合物,并通过核磁共振图谱进行了鉴定。传统的棋盘联合药敏试验测定的是一定时间后的终点抑菌结果,且结果依赖于肉眼观察浊度,结果不够动态

和准确。本文采用微量稀释法结合连续生长曲线分析恩诺沙星与 N^6 -(1-naphthyl)-ADP 联合药敏试验,结果更加清晰准确,与恩诺沙星联用,体现出一定程度的协同抑菌作用。通过抑制剂对 SOS 应答系统组分 *umuC* 基因表达量的影响,推测该抑制剂可能抑制 SOS 应答,从而起到一定的调控效果,但是显然还存在 *RecA* 以外其他的调控机制影响 SOS 应答,需要进一步探究。

本文系统论证了 *RecA* 抑制剂 N^6 -(1-naphthyl)-ADP 与恩诺沙星的联合抑菌作用。与 β -内酰胺类抗生素及其酶抑制剂相比,喹诺酮和 *RecA* 抑制剂药代动力学可能有较大差异,有效剂量还略高,另外对真核细胞的毒性尚待研究,但是作为以抑制基因突变为主要特色的具有较全面细胞影响力的抑制剂,仍然值得研究和优化^[24]。

参考文献

- 1 刘玉庆. 细菌抗药性. 北京: 化工出版社, 2012
- 2 刘玉庆. 环境抗药性. 北京: 化工出版社, 2014
- 3 Janion C. Some aspects of the SOS response system—a critical survey. *Acta Biochim Pol*, 2001, 48: 599–610
- 4 Kreuzer K N. DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *CSH Perspect Biol*, 2013, 5: a012674
- 5 Bugay A N, Krasavin E A, Parkhomenko A Y, et al. Modeling nucleotide excision repair and its impact on UV-induced mutagenesis during SOS-response in bacterial cells. *J Theor Biol*, 2015, 364: 7–20
- 6 Little J W. Mechanism of specific *lexA* cleavage: autodigestion and the role of *RecA* coprotease. *Biochimie*, 1991, 73: 411–421
- 7 Zhang A P P, Pigli Y Z, Rice P A. Structure of the *lexA*-DNA complex and implications for SOS box measurement. *Nature*, 2010, 466: 883–886
- 8 Bai H, Du J F, Hu M, et al. Analysis of mechanisms of resistance and tolerance of *Escherichia coli* to enrofloxacin. *Ann Microbiol*, 2012, 62: 293–298
- 9 Bhattacharjee A, Sen M R, Prakash P, et al. Role of β -lactamase inhibitors in enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemoth*, 2008, 61: 309–314
- 10 Ryan T, Jodie K, Floyd E, et al. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol*, 2005, 3: 1024–1033
- 11 Singh R, Ledesma K R, Chang K T, et al. Impact of *RecA* on levofloxacin exposure-related resistance development. *Antimicrob Agents Chemoth*, 2010, 54: 4262–4268
- 12 Sexton J Z, Wigle T J, He Q P, et al. Novel inhibitors of *E. coli* *RecA* ATPase activity. *Curr Chem Genomics*, 2010, 4: 34–42
- 13 Datsenko K A, Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6640–6645
- 14 CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Forth Edition. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013. 23–24
- 15 刘玉庆, 李靖冉, 杜加法, 等. 用线性梯度平板准确测定药物敏感性和分离抗药性菌株. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41: 748–755
- 16 Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, 61: 377–392
- 17 Fernández De Henestrosa A R, Ogi T, Aoyagi S, et al. Identification of additional genes belonging to the *lexA* regulon in *Escherichia coli*. *Microbiol*, 2000, 35: 1560–1572
- 18 Courcelle J, Khodursky A, Peter B, et al. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, 2001, 158: 41–64
- 19 Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, et al. Prevalence of SOS-mediated control of integron/integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mobile DNA*, 2011, 2: 2–15

- 20 Beaber J W, Hochhut B, Waldor M K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 2004, 427: 72–74
- 21 Da Re S, Garnier F, Guérin E, et al. The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Rep*, 2009, 10: 929–933
- 22 Lee N, Yuen K Y, Kumana C R. Clinical role of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. *Drugs*, 2003, 63: 1511–1524
- 23 Lahiri S D, Johnstone M R, Ross P L, et al. Avibactam and class C β -lactamases: mechanism of inhibition, conservation of the binding pocket, and implications for resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58: 5704–5713
- 24 杨进波, 孙涛. 开发含 β -内酰胺酶抑制剂复方抗生素及临床评价的基本考虑. *中国执业药师*, 2009, 6: 25–27

Effect of SOS-response Inhibition on Enrofloxacin Resistance in *Escherichia coli*

WANG JinWen^{1,2}, HU Ming^{1,2}, BAI Hua^{1,2}, YAN ShiGan^{1,2}, LI LuLu^{1,2}, LUO YanBo^{1,2}, QI Jing^{1,2}, HAN Zhe³ & LIU YuQing^{1,2}

1 College of Agriculture, Shandong University, Jinan 250101, China;

2 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250101, China;

3 New Material Institute, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

To explore the effect of SOS response on enrofloxacin resistance in *E. coli*, we deleted the *recA* gene, which encodes the inducer of SOS response, and evaluated the combined inhibitory effect of RecA inhibitor and enrofloxacin on *E. coli* *in vitro*. By Red recombination, a deficient strain *E. coli* ATCC 25922/ $\Delta recA$ was obtained. The expression of *recA* and *umuC* under the pressure of enrofloxacin was measured by real-time PCR. The minimum inhibitory concentration (MIC) of *E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* ATCC 25922/ $\Delta recA$ to many kinds of antibiotics, including enrofloxacin, were detected by broth dilution method. And the effect of *recA* deficiency on resistance variant to enrofloxacin was investigated by gradient plate method. N⁶-(1-naphthyl)-ADP, the inhibitor of SOS response, was synthesized and its influence combined with enrofloxacin on bacterial growth and resistance was evaluated. As results, *E. coli* ATCC 25922/ $\Delta recA$ was established successfully and its MIC was decreased to an eighth of original strain. Moreover, the *recA* deficient strain was less prone to develop resistance than *E. coli* ATCC 25922 when exposed to enrofloxacin. The results of real-time PCR showed that SOS response was inhibited in *recA*-deleted strain or with the action of RecA inhibitor. The *recA*-deleted *E. coli* ATCC 25922 was more susceptible to enrofloxacin and the rate of resistant variation was lower than that in wild-type strain, and the inhibitor of RecA can inhibit SOS response to a certain degree and assist enrofloxacin to inhibit bacteria growth.

***E. coli*, SOS response, *recA*, enrofloxacin, drug-resistance, RecA inhibitor**

doi: 10.1360/N052014-00280