

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

抗青黴素肺炎鏈球菌與草綠色鏈球菌之青黴素結合蛋白基因相關性

Relatedness of penicillin-binding protein genes among major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis*

計畫編號：NSC 89-2320-B-002-087

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：鄧麗珍 國立台灣大學醫學院 醫事技術學系

一、中英文摘要

細菌造成青黴素抗藥性原因有很多種，如產生 β -lactamases等。但許多報告已顯示出負責草綠色鏈球菌對青黴素抗藥之機轉與肺炎鏈球菌類似，主要為青黴素結合蛋白(PBPs, penicillin binding proteins)之基因及結構上改變。青黴素(penicillin)為傳統上第一選擇的主要治療用藥，然而抗藥性的產生及散布卻逐漸成為一嚴重的問題。我們收集從台大醫院分離出的三十四株 *Streptococcus oralis* 臨床菌株(最低抑菌濃度 MICs 範圍：0.032 到 6 $\mu\text{g/ml}$)，並以 API 系統及 16S rRNA 基因分別再次確定菌種。之後以 PCR 方法放大染色體上的 PBP 2b 及 2x 基因，再用限制酵素來進行切割反應，利用電泳分析來觀察，結果顯示 *S. oralis* 的 PBP 2b 及 2x 基因呈現高度的異質化，不同於已知的 *Streptococcus pneumoniae* 可與 MIC 值一同比較。無論是在敏感型、中間型或抗藥型的菌株之間，pbp 基因的 RFLP 型皆一致的並不多，尤其對 penicillin-susceptible 菌株，彼此間差異極大。序列分析結果顯示在 PBP 2b 方面，許多抗藥菌株在靠近第二個 homology box，Ser442SerAsn 附近的第 457 氨基酸由 Gln 改變成 His，而在抗藥型 *S. pneumoniae* 發現的第 445 氨基酸由 Thr 改變成 Ala 突變對 *S. oralis* 來說似乎並不絕對。在 PBP 2x 方面，則在第二個 homology box—Ser395SerAsn 與第三個 box—Lys547SerGly

之間發現了第 417 氨基酸由 Asn 改變成 Lys 以及第 506 氨基酸由 Asp 改變成 Glu。Transformation 試驗亦顯示抗藥型的 *S. oralis pbp2b* 及 *pbp2x* DNA 可轉殖到原為敏感型的肺炎鏈球菌菌株，且細菌對青黴素的 MIC 值也增加，顯示鏈球菌之間抗藥性可經由 transformation 散佈。

關鍵詞：草綠色鏈球菌、青黴素結合蛋白基因、序列分析、轉形實驗

Abstract

Penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* and viridans group streptococci has recently been reported with increasing frequency worldwide. Resistance to β -lactam in both viridans group streptococci and pneumococcus has been shown to be due to the development of altered penicillin-binding proteins (PBPs) with lowered affinity for penicillin. Horizontal transfer of these variant PBP genes enables bacteria to evolve rapidly by the acquisition of novel determinants of resistance. In this study, correlation between PBP genes and resistance to β -lactam in *S. oralis* was studied. We studied the thirty-four clinical isolates of *S. oralis* (MICs, 0.032 to 6 $\mu\text{g/ml}$) obtained from National Taiwan University Hospital (NTUH). The polymerase chain reaction was used to amplify the penicillin-binding domain of PBPs 2b and 2x from the chromosomal DNAs of the bacteria. PCR products were then digested with restriction enzymes. On the electrophoretic

profiling of PBPs 2b and 2x genes, the DNA fingerprintings of *S. oralis* were found to be highly heterogeneous. They were quite different from those obtained from *S. pneumoniae* which has been studied. Cloning and sequencing were also performed to analyze the nucleotides and amino acid composition around the homology boxes on PBP genes. In the case of PBP 2b, a substitution of Gln by His at position 457 (Gln457→His), closed to the homology box Ser442SerAsn was frequently observed in the resistant isolates. The particular Thr445→Ala mutation of *S. pneumoniae* seems to be not necessarily present in *S. oralis*. In PBP 2x, Asn417→Lys and Asp 506→Glu were found between the homology box Ser395SerAsn and Lys547SerGly. It remains to be clarified whether these substitutions effect a change in PBP affinity. As *S. pneumoniae* and viridans group streptococci coexist within the oral cavity it is quite possible that there is a complex network of interspecies gene transfer. Gene transfer between *S. oralis* and *S. pneumoniae* was also observed by transformation.

Keywords: *S. oralis*, penicillin-binding protein genes, sequencing, transformation

二、緣由與目的

草綠色鏈球菌為人體口腔內之常在細菌，但卻也是心內膜炎及許多深部組織嚴重感染之重要病原菌。過去草綠色鏈球菌對 penicillin 等藥物非常敏感，在我們 1987 年的報告中尚無菌株對 penicillin 產生抗藥性[1]。但近年來抗藥性草綠色鏈球菌之產生，尤其是對 penicillin，廣效性 cephalosporin 之抗藥性[2]，對臨床醫師治療該菌引起之感染，尤其是菌血症和深部組織感染，在藥物之選擇上造成相當大之問題。細菌造成 penicillin 抗藥性原因有很多種，如產生 β -lactamases 等。但負責肺炎球菌[3]及草綠色鏈球菌對 β -內醯胺類藥物的抗藥性之機轉主要是由於青黴素結合蛋白

(penicillin-binding protein) 結構改變以至於與青黴素的親和力降低所致[4,5]。PBPs 負責細菌細胞壁合成，屬於 penicilloyl serine transferases 之 superfamily。若 PBP 改變使其與 penicillin 之 affinity 降低卻又維持細胞壁合成之正常功能時，細菌就表現成抗藥性[6]。不同藥物與不同之 PBPs 間親和力並不太相同。在高抗藥性的肺炎球菌常是多種 PBPs 均有改變，其中以 PBP2X 及 PBP2B 為最主要[7]。PBP2X 的改變可引起低程度的抗藥，並被認為與 cefotaxime 等較有關[8]；PBP2B 的改變可引起第二階段的抗藥且與 piperacillin 等較有關[9]。此外抗藥性的肺炎球菌之 PBP 基因常有 mosaic 構造，此種 mosaic 構造之 DNA 序列常可在草綠色鏈球菌中發現。而多重抗藥性肺炎球菌，其抗藥基因除了可以在同種 (species) 或同屬 (genus) 之菌株間傳遞外，並可藉由帶菌者之攜帶而在不同地區之間散佈[10-20]。由於直至目前大部分研究報告的重點均是針對肺炎球菌。PBP 2B 及 PBP 2X 在草綠色鏈球菌扮演的角色並不清楚。基因的傳遞置換使得某一 DNA 的 fingerprinting 呈現多樣化的型態 (polymorphism) 而不一致。以 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 的方法可觀察基因特定的「型」(pattern) 或是「輪廓」(profile)。用特定的引子 (primers) 以 PCR 方法放大要分析的基因，再以限制酵素作用切割，在電泳膠片上便可分出大小不同的 DNA 片段；每一種不同的「型」即代表其序列組成可能是不同的。利用這種方法可先對細菌基因上的差異進行初步的觀察 (screening)，在不同藥物感受型 (susceptible, intermediate or resistant) 的菌株中，其表現型 (phenotype) 與基因型 (genotype) 之間是否有什麼相關性。更進一步的研究發現抗藥的主要機轉—藥物目標物結構的改變，發生在高分子量青黴素結合蛋白 1A, 2X 以及 2B (high-molecular-weight PBPs 1A, 2X and 2B)，特別是在包含具有生物活性的絲胺酸 (active-site serine) 的三個固定的、較少變異的區域 (homology boxes) 周圍附近，

這三個區塊 (motif) 的氨基酸組成分別為：SXXK、SXN 以及 K(H)T(S)G。分析肺炎鏈球菌抗藥型變異菌株之 PBP 2B 基因發現在緊接著 SXN motif 後面的第 445 個氨基酸大多由 Thr 突變成 Ala。由於目前的研究大多注重在肺炎鏈球菌，對於草綠色鏈球菌之抗藥機轉的研究相當有限，因此，此計劃想瞭解在草綠色鏈球菌 *S. oralis* 中，此位置的氨基酸突變是否與抗藥有關聯，及突變基因在 *S. oralis* 與肺炎鏈球菌之間的關係。

三、結果

草綠色鏈球菌中以 *Streptococcus oralis* 最具抗藥性[2]。本計劃收集 32 菌株，包括敏感型 (susceptible, MIC, $\leq 0.12 \mu\text{g/ml}$)，中間型 (intermediate)，與抗藥型 (resistant, MIC, $\geq 4 \mu\text{g/ml}$)。用已知之序列合成引子進行 PCR。在上計劃中已將這些 pbp 2b 及 pbp2x 基因的 PCR 產物，以 *AluI*、*HinI*、*SlyI* 三種限制酵素進行切割反應，比對切割出的大小片段 DNA 在瓊脂電泳片上所分佈成的「型」(pattern or profile) 異同如何。結果發現在收集到的草綠色鏈球菌 *S. oralis* 之中，PCR-RFLP 結果顯示 pbp 2b 基因及 pbp 2x 基因均非常地異質化 (heterogeneous)，無論是在敏感型、中間型或抗藥型的菌株之間，pbp 基因的 RFLP 型皆一致的並不多。序列分析初步結果顯示 pbp 2b 基因第二 conserved box 部份，Threonine to Alanine 的改變與 *S. oralis* 抗藥似無直接關係。但在第 457 氨基酸位置，發現許多抗藥菌株有同樣變成 His 的情形；敏感型菌株在此位置的氨基酸組成則全都是 Gln，且包括 *S. oralis* ATCC 35037 標準菌株及兩株抗藥型菌株 R1 (7203)、R7 (1156)；另外在 R4 (1316) 和 R6 (B904)、R11 (393) 三株抗藥菌株尚有第 455 位置氨基酸變為 Ile，不同於其他菌株的 Met 組成。

此計劃繼續分析 pbp 2x 基因的序列。發現。針對 2x 基因上三個 homology boxes, SXXK、SSN、KSG 附近的序列進行比較；利用 Ora 2X 712/Ora 2X 1873 引子

放大的片段基因一端讀序可得到前兩個 homology boxes 附近的序列(圖一)，比對的結果，在 SSN box 之後第 417 氨基酸有 Asn/Lys 的差別(圖二)，抗藥型菌株為 Lys 組成，其中 S3 (1839) 由於讀出的序列較短，尚無法分析此位置的氨基酸序列；而敏感型菌株 S8 (9611) 可見到與兩株敏感型菌株 *S. pneumoniae* R6、*S. oralis* M3 有比較相似的基因及氨基酸序列。抗藥型 *S. pneumoniae* 菌株的 pbp 2X 部份基因則列於圖三。

四、討論

RFLP 是用來鑑定基因關係遠近的方法之一，利用限制酵素切割欲分析的 DNA 基因，觀察切割型來分析其 fingerprinting。本計劃中利用 San 2B up 及 Pn 2B down 引子放大出所有 34 株臨床菌株的 pbp 2b 片段基因，三種酵素的切割型比對結果，在敏感型、中間型、抗藥型之間均呈現頗高的異質性，每一種限制酵素的切割型至少大於 20 種，其中 *AluI* 的切割型，在 34 菌株中更高達 30 種型。我們的報告亦指出，在 *S. pneumoniae* 臨床菌株 pbp 2b 基因的 RFLP 型之中，敏感型菌群的切割型較一致，抗藥型菌群的切割型變化較大[3]，fingerprinting 的結果隨著 MIC 值的提高，差異愈大。敏感型菌株與自然界原本存在的菌株較接近，基因的變化不大，所以 RFLP 的型較一致；但因為種種演化上的基因變異、傳遞與諸如抗生素用藥等的環境選擇壓力，含有複雜的、已改變的基因的抗藥型菌株逐漸被篩選生存下來，結果可見到 RFLP 型的差異與 MIC 值的提高呈現正比增加的情形。在草綠色鏈球菌中尚未見到這種由 pbp 基因的 RFLP 型可預見抗藥的程度，實驗的結果顯示，敏感型 *S. oralis* 臨床菌株的 fingerprinting 亦不一致，與中間型、抗藥型同樣呈現異質化的現象。此外由 pbp 2b 基因的 RFLP 結果中顯示，S6 (c7244) 與 S7 (4106) 的三種 RFLP 型皆一樣。以往的研究曾指出，在 *S. pneumoniae* 臨床菌株 pbp 2b 基因的 RFLP 型之中，敏感型菌群的切割型較一致，抗

藥型菌群的切割型變化較大，fingerprinting 的結果隨著 MIC 值的提高，差異愈大。在草綠色鏈球菌中敏感型 *S. oralis* 臨床菌株的 fingerprinting 亦不一致，與中間型、抗藥型同樣呈現異質化的現象。

DNA 的定序是觀察基因是否有變異的最直接證據，利用特定的引子放大要分析的基因片段，再予以轉殖到大腸桿菌的質體上，當要進行定序反應時，大量培養此大腸桿菌並製備的質體會有較高的核酸純度，定序反應的結果也比較準確。在本篇論文的實驗中亦以這種方法探討 *pbp 2b* 及 *2x* 基因上部份片段的序列，在抗藥型菌株和敏感型菌株之間有什麼值得注意之處。本篇實驗發現的第 457 氨基酸 Gln 變成 His 則明顯地出現在抗藥型菌群的 *pbp 2b* 基因上，這個氨基酸的變異對 *S. oralis* 的抗藥性質到底扮演什麼樣的角色，則還要進一步的實驗證明才能瞭解。敏感型菌株 *S. pneumoniae* R6、*S. oralis* 含有不同於抗藥菌株的四個共同處，分別在第一個 homology box，SXXK 之後第 364 氨基酸同為 Leu，第 366 位置同為 Ile，第 371 位置亦同為 Ile 及第 384 位置同為 Arg，可見得原本自然界中的敏感型菌株似乎有比較一致的基因型，但因後來的種種因素產生了變異，而帶有抗藥的性質。至於第三個 homology box KSG 附近的序列分析，則找到在 KSG box 前第 506 氨基酸位置，抗藥型的菌株大多為 Glu (6 株/8 株)，而敏感型菌株多為 Asp (5 株/7 株) 的情形。

在我們最近發表的報告指出，台灣分離之肺炎鏈球菌對青黴素具抗藥的菌株之血清型以 23、19、6 為主，且由初步的 *pbp* PCR-fingerprinting 與脈衝電泳結果顯示有幾個主要的 clone 在流行。由於肺炎鏈球菌與草綠色鏈球菌的抗藥性習習相關，而鏈球菌屬中，亦有許多報告指出不同菌種之間 (inter-species) 可有基因平行互傳 (horizontal gene transfer) [8-17]。抗藥基因的傳遞，再加上共生的環境因素，細菌抗藥性的散布極為容易發生，對於臨床醫學上感染症的研究以及疾病的治療有很大的影響力。此外許多研究利用 DNA 序列的

比對，觀察到鏈球菌基因上的「馬賽克結構」(mosaic structure)，並可推論片段基因的來源。在此計劃中，我們也以 transformation 方式將抗藥型的 *S. oralis pbp2b* 及 *pbp2x* DNA 成功轉殖到原為敏感型的肺炎鏈球菌菌株，且細菌對青黴素的 MIC 值也增加，顯示鏈球菌之間抗藥性可經由 transformation 散佈。本計劃結果也將有助於將來設計適合本土菌株快速偵測方法的重要依據。

五、成果自評

- (1). PCR-RFLP: 大多數菌株 *pbp2b* or *pbp2x* 基因的 PCR-RFLP 已順利完成，結果顯示 *pbp 2b* 基因及 *pbp 2x* 基因均非常地異質化 (heterogeneous)。
- (2). *pbp2b* 序列分析：完成第二 conserved box 部份，初步結果顯示 Threonine to Alanine 的改變與 *S. oralis* 抗藥無直接關係，但在第 457 氨基酸位置，發現許多抗藥菌株有同樣變成 His 的情形。在 *PBP 2x* 方面，則在第二個 homology box—Ser395SerAsn 與第三個 box—Lys547SerGly 之間發現了第 417 氨基酸由 Asn 改變成 Lys 以及第 506 氨基酸由 Asp 改變成 Glu。
- (3). *pbp2x* 序列分析：針對 *2x* 基因上三個 homology boxes，SXXK、SSN、KSG 附近的序列進行比較，抗藥型及敏感型菌株有變異情形。
- (4). Transformation: 已進行 *pbp2b*, *pbp2x* 之 transformation 實驗。

六、參考文獻

- [1] Chang SC, Luh KT, Teng LJ, Hsieh WC. 1987. Bacteriology of viridans streptococcal bacteremia. Chinese J Microbiol and Immunol. 20:311-319.
- [2] Teng LJ, Hsueh, PR, Chen YC, Ho SW, Luh KT. 1998. Antimicrobial susceptibility of viridans group streptococci in Taiwan with an emphasis on the high rates of resistance to penicillin and macrolides in *Streptococcus oralis*. J Antimicrob Chemother 41:621-7.

- [3] Hsueh PR, Teng LJ, Lee LN, Yang PC, Ho SW, Luh KT. 1999. Dissemination of high-level penicillin-, extended-spectrum cephalosporin-, and erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones in Taiwan. *J Clin Microbiol* 37:221-224.
- [4] Chakley LJ and Koornhof HJ. 1988. Penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 22:791-800.
- [5] Farber BF, Eliopoulos GM, Ward JI, et al. 1983. Multiply resistant viridans streptococci: Susceptibility to β -lactam antibiotics and comparison of penicillin-binding protein patterns. *Antimicrob Agents Chemother* 24:702-5.
- [6] Dowson CG, Coffey TJ, Spratt BG. 1994. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to β -lactam antibiotics. *Trends in Microbiology* 2:361-6.
- [7] Smith AM, Klungman KP, Coffey TJ, Spratt BG. 1993. Genetic diversity of penicillin-binding protein 2B and 2X genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1938-44.
- [8] Munoz R, Dowson CG, Daniels M et al. 1992. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 6:2461-2465.
- [9] Dowson CG et al. 1989. Extensive re-modeling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2B of a penicillin-resistant South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 3:95-102.
- [10] Laible et al., 1991. Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2X genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 5:1993-2002.
- [11] Martin et al., 1992. Relatedness of penicillin-binding protein 1a genes from different clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. *EMBO* 11:3831-6.
- [12] Dowson CG et al. 1990. Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5858-62.
- [13] Dowson CG et al. 1993. Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol* 9:635-43.
- [14] Sibold C et al. 1994. Mosaic *pbpX* genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from *pbpX* genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol Microbiol* 12:1013-23.
- [15] Hakenbeck R. 1995. Target-mediated resistance to β -lactam antibiotics. *Biochem Pharma* 50:1121-1127.
- [16] Hakenbeck R. et al. 1999. β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol* 33:673-678.
- [17] Grebe T and Hakenbeck R. 1996. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 40:829-34.
- [18] Asahi Y et al. 1999. Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1252-1253.
- [19] Potgieter, E. and Chalkley, L.J. 1995. Relatedness among penicillin-binding protein 2b genes of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance* 1: 35-42.
- [20] Reichmann, P., König, A., Liñares, J., Alcaide, F., Tenover, F.C., McDougal, L.,

Swidsinski, S., and Hakenbeck, R. 1997.
A global gene pool for high-level
cephalosporin resistance in commensal
Streptococcus species and *Streptococcus*
pneumoniae. J. Infect. Dis. 176:
1001-1012.

Consensus	CGAGATTGGG	AYGTTAATGR	DGGHKTGACT	ACTGGTRGCA	GDAATGATGAC	TTTTTYWCRA	GGTKTYGCWC	WCG	225
S.P. R6C.....	A.A..AT.....	---G...A.....G...A.....T.CT.A.....T.T.A.....T.T.A.....	A...A	222
S.o. M3T.....	A.T..TT.....A.--G.....C.CA.A.....T.C.T.A.....T.C.T.A.....T.C.T.A.....	A...C	222
S3-1T.....	A.A..TT.....G.--G.....C.TA.A.....T.C.T.A.....T.C.T.A.....T.C.T.A.....	A...C	222
S8-1T.....	A.T..TT.....A.--G.....C.CA.A.....T.C.T.A.....T.C.T.A.....T.C.T.A.....	T...C	222
R1-2T.....	G.T..TT.....G.--G.....C.TA.A.....G.C.T.A.....G.C.T.A.....G.C.T.A.....	A...C	222
R2-2T.....	A.A..TT.....G.--G.....C.TA.A.....T.C.T.A.....T.C.T.A.....T.C.T.A.....	A...C	222
R9-3T.....	A.A..TG.....A.--T.....C.TA.A.....T.C.T.A.....T.C.T.A.....T.C.T.A.....	A...C	222
R10-1T.....	A.G..TT.....G.--G.....C.CA.G.....T.C.T.A.....T.C.T.A.....T.C.T.A.....	A...C	222
Consensus	ACTAAGTTG	GRAYGASYCT	HCTTGARCAA	AARATGGGRG	ATGCTACYTG	GYTKGATAT	CTWAGCGYT	TTAAA	300
S.P. R6C.....	G.T..CC..	C.....G...C.....G...A.....C...C.T.....C.T.....T.T.T.....	297
S.o. M3T.....	A.T..GT..	A.....A...A.....A...A.....T...T.G.....A.C.C.....A.C.C.....	297
S3-1T.....	A.T..GT..	A.....A...A.....A...A.....T...T.G.....A.C.C.....A.C.C.....	280
S8-1T.....	A.T..GT..	T.....A...A.....G...G.....T...T.G.....A.C.C.....A.C.C.....	297
R1-2T.....	A.T..GT..	A.....A...A.....A...A.....T...T.G.....A.A.C.....A.A.C.....	297
R2-2T.....	A.T..GT..	A.....A...A.....A...A.....T...T.G.....A.A.C.....A.A.C.....	297
R9-3T.....	A.T..GT..	A.....A...A.....A...A.....T...T.G.....A.A.C.....A.A.C.....	297
R10-1T.....	A.C..GT..	A.....A...A.....A...A.....T...T.G.....A.A.C.....A.A.C.....	297

圖一、以 Ora 2X 712/Ora 2X 1873 引子放大的 PBP 2x 基因片段核酸定序的結果。*，變異的核酸位置（第 417 氨基酸位置）。其中包括 *S. oralis*M3 及 *S. pneumoniae* R6 菌株 PBP 2x 的基因序列(EMBL/GenBank accession no. 為 X78217 及 X16367)

Consensus	FVWRDILYQS NYEPG	MTLASSIDNN TSPSGEYFNS SEFKMADATF RDMDVNEGLT TG.MMTF.QG FAFSS	75
S.P. R6T...	.M.AA.... .F.G.V... .L.I....I G.R....S..	75
S.O. M3T...	.F..... .L.I....ID... .R....S..	75
S3-1A...	.M..... .G..... .G....L..	75
S8-1T...	.A..... .L.I....ID... .R....S..	75
R1-2A...	.A..... .G..... .G....L.. V....	75
R2-2A...	.M..... .G..... .G....L..	75
R9-3G...	.G..... .V..... .S....L..	75
R10-1AF..	.F..... .G..... .SR.	75

Consensus	IVGMSLLEOK MGDATWLDYL	REFKGVPTF FGLTDEYAG.	115
S.P. R6T....N..... .Q	115
S.O. M3N.....Q	115
S3-1--	-----	93
S8-1N.....	-----	112
R1-2K.....	...P L...-----	109
R2-2K.....P	115
R9-3K.....P	115
R10-1T.....K.....Q	115

圖二、以 Ora 2X 712/Ora 2X 1873 引子放大的 PBP 2x 基因片段氨基酸序列比對的結果。*，變異的第 417 氨基酸位
 置。其中包括 *S. oralis*M3 及 *S. pneumoniae* R6 菌株 PBP 2x 的基因序列 (EMBL/GenBank accession no. 為 X78217 及
 X16367)

(A) *S. pneumoniae* pbp 2x 1185/1424 DNA Alignment

Consensus	TATAAGTGCT	ATTTATGATA	CTAACAAATCA	GTCTGTACGT	AAGTCACAAA	50
S.p.9	50
S.p.40	50
S.p.41	50
S.p.136	50
S.p.129	50
Consensus	RAGAAATAGT	AGGAAATCCT	GTTTCCAAAG	<u>AGGCAGCAAG</u>	CACAACTCGA	100
S.p.9	A.....	100
S.p.40	A.....	100
S.p.41	A.....	100
S.p.136	G.....	100
S.p.129	A.....	100
Consensus	AATCACATGA	TCTTAGTTGG	GACGGACCTT	CTATATGGAA	CTATGTATAA	150
S.p.9	150
S.p.40	150
S.p.41	150
S.p.136	150
S.p.129	150
Consensus	TCACTACACA	GGAAAGCCAA	TTATAACAGT	TCCTGGACAA	AATGTAGCAG	200
S.p.9	200
S.p.40	200
S.p.41	200
S.p.136	200
S.p.129	200
Consensus	^{K S G} TTAAATCGGG	TACGGCTCAA	ATCGCTGATG	AGAAAAAT		238
S.p.9		238
S.p.40		238
S.p.41		238
S.p.136		238
S.p.129		238

(B) *S. pneumoniae* PBP 2X 1185/1424 a.a. Alignment

Consensus	ISAIYDTNNQ	SVRKSQKEIV	GNPVSKEAAS	TTRNHMILVG	TDPLYGTMYN	50
a.a. of S.p.136R...	50
a.a. of S.p.129	50
a.a. of S.p.41	50
a.a. of S.p.40	50
a.a. of S.p.9	50
Consensus	HYTGKPIITV	PGQNVAV <u>KSG</u>	TAQIADEKN			70
a.a. of S.p.136			70
a.a. of S.p.129			70
a.a. of S.p.41			70
a.a. of S.p.40			70
a.a. of S.p.9			70

圖三、抗藥型 *S. pneumoniae* 菌株的 pbp 2X 部份基因序列。(A)核醜序列 (B)氨基酸序列。