

DOI:10.13350/j.cjpb.200509

• 论著 •

# 大肠埃希菌外排泵 AcrAB-TolC 调控基因的表达与季铵盐化合物抗性关系的研究

代冰洁, 祁萌, 贾宇驰, 祁伟\*

(天津医科大学第二医院, 天津 300211)

**【摘要】** **目的** 研究大肠埃希菌外排泵 AcrAB-TolC 的调控基因 marR、marA、soxS、rob 在季铵盐化合物(quaternary ammonium compounds, QACs)耐药中的作用。**方法** 取 6 株大肠埃希菌临床分离株,应用苯扎溴铵进行诱导,采用琼脂稀释法检测菌株在加入外排泵抑制剂氰化羰基-3-氯苯腙(Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazine, CCCP)前后对苯扎溴铵的敏感性;PCR 扩增外排泵调控基因 marR、marA、soxS、rob 并测序;采用实时荧光定量 PCR 检测 marR、marA、soxS、rob 基因的转录水平。**结果** 5 株诱导株的苯扎溴铵最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)较其亲代增高 4~8 倍;加入外排泵抑制剂后 11 株菌的苯扎溴铵 MIC 值较加入前下降 50.00%~99.61%,且诱导后的菌株下降率显著高于诱导前( $Z=-2.943, P=0.003$ ),5 株诱导株的 MIC 值较其亲代下降 50.00%以上;4 株诱导株 marA 基因的转录水平较其亲代增高 17~33 倍,5 株诱导株 marR 基因的转录水平较其亲代增高 1~10 倍( $P<0.05$ );12 株菌中有 10 株菌外排泵调控基因 marR 存在 142 位 Tyr 的缺失,11 株菌 marA 基因存在 145 位 Ser 缺失和 Met1Val 突变,10 株菌 soxS 基因存在 Ser12Ala 突变。**结论** marA 基因转录增加致外排泵 AcrAB-TolC 的高表达与季铵盐化合物对大肠埃希菌的抗性产生可能有一定关联。

**【关键词】** 大肠埃希菌; 季铵盐化合物; 外排泵; 调控基因

**【中图分类号】** R378.21

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2020)05-0541-05

[Journal of Pathogen Biology. 2020 May; 15(5): 541-545.]

## Study on the relationship between overexpression of AcrAB-TolC efflux pump regulatory genes and resistance to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*

DAI Bing-jie, QI Meng, JIA Yu-chi, QI Wei (The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin, China 300211)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the role of the AcrAB-TolC efflux pump regulatory genes marR, marA, soxS, and rob in resistance of *Escherichia coli* to quaternary ammonium compounds (QACs). **Methods** Six *Escherichia coli* strains from clinical sources were selected and exposed to benzalkonium bromide in vitro. The sensitivity of the 6 resistant strains and their parent strains to benzalkonium bromide was determined using the agar dilution method before and after the addition of the efflux pump inhibitor carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazine (CCCP). The AcrAB-TolC efflux pump regulatory genes marR, marA, soxS, and rob were amplified using PCR and sequenced. The level of transcription of the marR, marA, soxS, and rob genes was determined using quantitative real-time PCR. **Results** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of 5 strains exposed to benzalkonium bromide was 4-8 times higher than that of their parent strains. The MIC of benzalkonium bromide decreased by 50.00-99.61% for 11 strains after the addition of CCCP, and the rate of decline in the MIC was significantly higher for exposed strains than their parent strains ( $Z=-2.943, P=0.003$ ). The MIC for 5 exposed strains decreased by more than 50.00% compared to that of their parent strains. The level of transcription of the marA gene in 4 exposed strains was 17-33 times higher than that of their parent strains, and the level of transcription of the marR gene was 1-10 times higher than that of their parent strains in 5 exposed strains ( $P<0.05$ ). A tyrosine deletion was found at codon 142 of marR in 10 strains, a mutation causing a substitution of valine for methionine was found at codon 1, and a serine deletion was found at codon 145 of marA in 11 strains, and a mutation causing substitution of alanine for serine was found at codon 12 of soxS in 10 strains. **Conclusion** The increased level of transcription of the regulatory gene marA of the AcrAB-TolC efflux pump may be related to the resistance of *E. coli* to QACs.

**【Key words】** *Escherichia coli*; quaternary ammonium compounds; efflux pump; regulatory gene

\* 季铵盐化合物(quaternary ammonium compounds, QACs)由于具有无腐蚀、无刺激性、较稳定且毒性低

\* **【通讯作者】** 祁伟, E-mail: qiweiwyx@163.com

**【作者简介】** 代冰洁(1992-),女,重庆涪陵人,研究生,主要研究方向:细菌耐药。E-mail:421201384@qq.com

等优点而被广泛用于医院、食品和环境的消毒<sup>[1]</sup>。部分季铵盐化合物在使用后被直接排放到环境当中,经稀释、生物降解后使其浓度下降,导致微生物常暴露于季铵盐化合物的亚抑菌浓度之中而产生耐药。McCay等<sup>[2]</sup>报道微生物对季铵盐化合物的耐药已呈逐年上升的趋势,且有研究表明微生物对季铵盐化合物与氟喹诺酮类抗菌药物存在交叉耐药<sup>[3]</sup>。目前对消毒剂耐药性研究的对象主要为革兰阳性菌中的葡萄球菌,但相对革兰阳性细菌,革兰阴性细菌对消毒剂表现出更强的耐药性<sup>[4]</sup>。

祁萌等<sup>[3]</sup>的研究结果显示外排泵 AcrAB-TolC 表达水平升高与大肠埃希菌对季铵盐化合物的耐药有关。本研究拟通过对外排泵 AcrAB-TolC 的调控基因的扩增测序及转录水平的测定,进一步了解大肠埃希菌对季铵盐化合物耐药性产生的分子机制,阐明外排泵 AcrAB-TolC 的调控基因在大肠埃希菌对季铵盐类化合物耐药中的作用。

## 材料与方 法

### 1 材 料

**1.1 菌株** 大肠埃希菌分离自天津医科大学第二医院住院及门诊患者尿液、痰及粪便等标本, -80℃保存。质控菌株大肠杆菌 ATCC25922 为本所保存。

**1.2 主要试剂** 苯扎溴铵和氰化羰基-3-氯苯胺(CCCP)均购自美国 SIGMA 公司;水解酪蛋白琼脂购自上海伊华生物科技有限公司;琼脂糖和焦磷酸二乙酯均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;BioE-asy Master Mix (SYBR Green)购自博日科技有限公司;Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (k1622)购自美国 Thermo 科技有限公司;EASYspin Plus 细菌 RNA 快速提取试剂盒购自艾德莱生物有限公司。

**1.3 主要仪器** 电热恒温培养箱为中国上海新苗医疗器械制造有限公司生产;PCR 仪为德国 Eppendorf 公司生产;DYY-6D 型电泳仪为北京六一仪器厂生产;721 分光光度计为中国上海精密仪器有限公司生产;超微量分光光度计为英国 Picodrop 公司生产;Line-gene Real-Time PCR Detection System 为杭州博日科技有限公司生产。

### 2 方 法

**2.1 苯扎溴铵诱导耐药试验** 参考曾杨梅等<sup>[5]</sup>的诱导方法并作充分调整。配制含 1、2、1、2、4 MIC 等递增梯度浓度苯扎溴铵的琼脂培养基。挑取适量菌落接种于含 1/2 MIC 苯扎溴铵浓度的培养基,37℃培养 24 h,待细菌生长后测定其对苯扎溴铵的 MIC 值。挑选生长良好的适量菌落接种于含 1 MIC 苯扎溴铵浓

度的培养基,37℃培养 24 h。以此类推,逐渐提高培养基中诱导药物浓度,并在空白培养基中传代 5 次以稳定其耐药性。

**2.2 苯扎溴铵敏感性检测** 采用琼脂稀释法检测细菌对苯扎溴铵的敏感性,试验重复 3 次。

**2.3 外排泵抑制试验** 采用琼脂稀释法检测菌株对 CCCP 的敏感性。配制含 0、2.5、5、10、15、20、30、40 μg/ml 浓度的 CCCP 琼脂培养基,以无菌生长的最低浓度作为其最低抑菌浓度。配制含 0、1、2、4、8、16、32、64、128、256 μg/ml 浓度的苯扎溴铵琼脂培养基,加入外排泵抑制剂后检测细菌对苯扎溴铵敏感性的变化<sup>[6]</sup>,加入的 CCCP 浓度低于其对 CCCP 的最低抑菌浓度,试验重复 3 次。

**2.4 外排泵调控基因检测** PCR 检测外排泵调控基因,扩增引物如表 1。煮沸法提取细菌 DNA,以此为模板,配置 25 μl 反应体系:Premix taq 酶 12.5 μl、模板 DNA 2.5 μl、上游引物 0.5 μl、下游引物 0.5 μl、去离子水 9 μl。反应条件:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,退火温度如表 1,时间 30 s,72℃延伸 2 min,共 30 个循环;72℃温育 5 min,于 4℃终止反应。PCR 产物进行 1%~2%的琼脂糖凝胶电泳,于 GelDoc-200 凝胶成像系统观察结果。

**2.5 实时荧光定量 PCR 检测目的基因的表达** 实时荧光定量 PCR 检测菌株的外排泵调控基因 marR、marA、soxS 和 rob,扩增引物如表 1。按试剂盒说明书操作步骤提取细菌总 RNA,并转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR 采用 20 μl 反应体系:2×SYBR Green Mix 10 μl、模板 DNA 2 μl、上游引物 1 μl、下游引物 1 μl、去离子水 6 μl。反应条件:95℃预变性 3 min;95℃变性 15 s,退火温度如表 1,时间 40 s,57℃延伸 40 s,共 40 个循环。使用 16S rRNA 作为内参基因,每株菌均重复检测 3 次,取平均值,并以大肠埃希菌 ATCC25922 为标准对照菌株。

**2.6 外排泵调控基因片段核酸测序分析** 对 12 株菌 marR、marA、soxS 和 rob 基因进行测序分析,序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

## 结 果

### 1 诱导前后细菌对苯扎溴铵的敏感性变化

6 株实验菌株诱导前的苯扎溴铵 MIC 值范围为 16~32 μg/ml,其中 4 株 MIC 值为 16 μg/ml,2 株 MIC 值为 32 μg/ml。5 株菌株诱导后的苯扎溴铵 MIC 值较诱导前增高 4~16 倍。ATCC25922 在诱导前后对苯扎溴铵的敏感性无显著变化。

表1 PCR及RT-PCR引物序列及特征  
Table 1 The sequences and features of primers used for PCR and RT-PCR

目的基因 Gene	引物序列(5'→3') Sequence	片段长度(bp) Length	退火温度(°C) Temperature
Primers used for PCR			
marR	Pimer-F: CACTCTTTAGCTAGCCTTG Pimer-R: TGGACATCGTCATACCTCT	604	51
marA	Pimer-F: ATGTCCAGACGCAATACTGAC Pimer-R: CTAGCTGTTGTAATGATTTAATGGATG	384	52.2
soxS	Pimer-F: TTACAGCGGTGGCGATAA Pimer-R: ATGTCCCATCAGAAAATTATTCA	324	48
rob	Pimer-F: CGGGGTACCATGGATCAGGCC Pimer-R: GTCTCTAGATTAACGACGGATCGGA	870	50
Primers used for RT-PCR			
marR	Pimer-F: CTGCGCGCGTGTATTACTCC Pimer-R: AGACCAGGCGATCCAGCATACG	89	58
marA	Pimer-F: CTGAAGGAAAGTAACGAGCCG Pimer-R: GATTCGCCCTGCATATTGGT	140	59
soxS	Pimer-F: ATGTAATCGCCAAGCGTCTG Pimer-R: GTAGTCGCAAAAAATCAGGCT	86	58
rob	Pimer-F: CGAGAAAATCGTGCCAGAAC Pimer-R: AAGATACGCCGTGATTGG	104	58
16SrRNA	Pimer-F: GGATTAGATACCCTGGTAGTCC Pimer-R: TCGTTGCGGGACTTAACCAACT	300	58

## 2 外排泵抑制试验结果

加入外排泵抑制剂后除菌株 614 对苯扎溴铵敏感性无显著变化外,其余菌株的苯扎溴铵 MIC 值下降 50.00%~99.61%,其中诱导后的菌株除 ATCC 25922 外苯扎溴铵 MIC 值较其亲代均下降 50%以上(表 2)。使用 SPSS 软件对数据进行正态性检验和统计学分析,经检验数据不符合正态分布,使用非参数检验,经检验 Z 值为 -2.943, P 值为 0.003,提示差异有统计学意义。

表 2 外排泵抑制剂处理后菌株对苯扎溴铵的敏感性变化  
Table 2 The results of benzalkonium bromide susceptibility test of strains after treatment with efflux pump inhibitors

菌株 Strain	苯扎溴铵 MIC(? g/ml)		
	不含 CCCP	含 CCCP	MIC 下降率(%)
25922	16	2	87.50
25922+	16	2	87.50
393	16	8	50.00
393+	128	2	98.44
432	32	16	50.00
432+	128	2	98.44
614	16	16	—
614+	256	1	99.61
632	32	2	93.75
632+	256	1	99.61
7220	16	2	87.50
7220+	64	2	96.88

注:“+”为诱导株。

## 3 外排泵调控基因检测

PCR 扩增 12 株大肠埃希菌 marA、soxS、rob 基因均阳性,阳性率为 100%;marR 基因阳性 11 株,阳性率为 91.67%。

## 4 实时荧光定量 PCR 检测

实时荧光定量 PCR 检测细菌的目的基因,每个循环结束系统自动采集荧光信号,检测每个循环荧光量,使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[7]</sup>计算出 marR、marA、soxS 和 rob 基因的相对表达量,每个样品重复 3 次,求均值,并与标准菌株 marR、marA、soxS 和 rob 基因相对表达量(值为 1.00)进行对比。使用 SPSS 软件对数据进行正态性检验和统计学分析,经检验数据符合正态分布,对实验结果进行配对资料的 t 检验,5 株菌诱导前后 marR 基因相对表达量差值均值为 -1.344, t 值为 -3.628, P 值为 0.022,提示差异有统计学意义;6 株菌诱导前后 marA 基因相对表达量差值均值为 -20.447, t 值为 -2.247, P 值为 0.037,提示差异有统计学意义;6 株菌诱导前后 soxS 基因相对表达量差值均值为 -0.010, t 值为 -0.037, P 值为 0.486,提示差异无统计学意义;6 株菌诱导前后 rob 基因相对表达量差值均值为 0.672, t 值为 0.772, P 值为 0.237,提示差异无统计学意义(表 3)。

## 5 外排泵调控基因 marR、marA、soxS 和 rob 基因测序分析

将 marR、marA、soxS、rob 基因 PCR 产物测序后通过 NCBI 网站中的 BLAST 程序与 GenBank 已公布的大肠埃希菌序列进行比对显示,12 株受试菌的上述 4 种调控基因均有多处核苷酸突变,其中突变频率较高并导致氨基酸替换的是:marR 基因 142 位 Tyr 缺失(10/12),marA 基因 145 位 Ser 缺失和 Met1Val 突变(11/12),soxS 基因存在 Ser12Ala 突变(11/12)。

表3 菌株诱导前后 marR、marA、soxS 和 rob 基因的相对表达量  
Table 3 Relative expression of marR, marA, soxS and rob genes of induced isolates and their parent strains

菌株 Strain	marR <sup>-ΔΔCt</sup>	marA <sup>-ΔΔCt</sup>	soxS <sup>-ΔΔCt</sup>	rob <sup>-ΔΔCt</sup>
ATCC25922	1	1	1	1
25922+	1.25	0.88	0.93	1.31
393	0.72	1.3	1.95	3.17
393+	2.62	42.05	1.58	1.27
432	0.50	1.54	0.31	2.71
432+	2.13	52.27	1.36	4.16
614	0.61	1.85	0.53	2.59
614+	—	0.34	0.03	0.53
632	0.08	0.20	0.61	3.56
632+	0.80	6.22	0.02	0.03
7220	1.20	1.69	1.42	1.83
7220+	3.42	28.5	1.96	3.53

注：“+”为诱导株。

表4 marR、marA、soxS 和 rob 基因的氨基酸突变位点  
Table 4 Characteristics of Amino acid mutations in marR, marA, soxS and rob

菌株 Strain	marR	marA	soxS	rob
ATCC25922	142; Y→※	1; M→V 145; S→※	12; S→A	18; Q→H
25922+	142; Y→※	1; M→V 145; S→※	3; H→P 4; Q→S	12; S→A
393	142; Y→※	1; M→V 3; S→N 145; S→※	3; H→P 4; Q→S	12; S→A
393+	18; M→V 19; S→P 142; Y→S 20; R→E	1; M→V 3; S→N 145; S→※ 77; R→L	3; H→P 4; Q→S 12; S→A	70; A→T
7220	142; Y→※	1; M→V 145; S→※	3; H→P 4; Q→S 106; R→G	288; K→N
7220+	142; Y→※ 21; R→T	1; M→V 145; S→※	12; S→A	—
432	142; Y→※ 21; R→T	1; M→V 145; S→※ 62; K→R	12; S→A	—
432+	142; Y→※ 20; R→T 21; R→T	1; M→V 3; S→N 145; S→※	12; S→A	1; M→L
632	142; Y→※ 21; R→T	1; M→V 53; A→E 145; S→※	12; S→A	—
632+	142; Y→※ 20; R→T 21; R→T	1; M→V 53; A→E 145; S→※ 77; R→L	12; S→A	—
614	1; M→C 3; R→S 125; Y→S 126; N→T	1; M→V 53; A→E 145; S→※	12; S→A 106; R→P	—
614+	— — — — —	55; S→P 57; Q→N 58; Y→H 60; T→N	5; Q→K	41; E→P 42; V→M

注：“+”为诱导株；“※”表示氨基酸缺失。  
Note：“+” induced strain; “※” amino acid deletion.

药基因的可移动基因元件的存在,其中外排泵的过度表达是细菌对消毒剂耐药的主要机制<sup>[8]</sup>。外排泵通常由细胞质膜泵、质周蛋白和外膜通道蛋白组成<sup>[9]</sup>,可以清除进入细胞内的有毒物质<sup>[10]</sup>。

AcrAB-TolC 外排泵是大肠埃希菌占绝对优势的多重药物外排泵,在介导对季铵盐化合物的耐药中起重要作用。该泵受 marR、marA、soxS 和 rob 等多基因的调控<sup>[11]</sup>,其中 marA 为重要的全局调控基因<sup>[11]</sup>。MarA 通过与 MarRAB 启动子上方的 MarO 连接使 MarRAB 转录被激活,后者与 mar 调节基因附近与非热启动子相邻的 AcrAB 结合,使启动子与 RNA 聚合酶的亲和力增强,加快转录起始速率,产生大量的 AcrAB,从而增强外排泵 AcrAB-TolC 对底物的外排功能。MarA 能以同样的方式使 TolC 的表达量增加<sup>[12]</sup>。soxS 的表达水平由激活剂 SoxR 控制,通过超氧化物和氧化还原循环化合物(如百草枯)激活 SoxR 从而诱导 soxS 的表达,随后可诱导 soxRS 调节子的表达<sup>[13]</sup>。rob 是一种丰富的组成性表达蛋白<sup>[14]</sup>,其活性可被癸酸盐增强<sup>[15]</sup>。sdiA 也是一种正向调控基因,

各菌株诱导前后的氨基酸序列对比显示,marR 基因存在不同的氨基酸替换,393+与其亲代相比存在 Met18Val、Ser19Pro、Arg20Glu 突变;7220+与其亲代相比存在 Arg21Thr 突变;432+和 632+与其亲代相比存在 Arg20Thr 突变。marA、soxS 和 rob 基因序列诱导前后对比显示,诱导株与其亲代均存在多位点突变,但突变位点分散(表4)。

## 讨论

随着消毒剂的广泛使用,细菌对消毒剂耐药已成为一个不可忽视的全球性问题,其耐药机制包括:外排泵的过度表达、膜孔蛋白表达减少以及携带季铵盐耐

其过表达也导致 AcrAB-TolC 外排系统的过表达<sup>[16]</sup>。marR 是一种负向调节基因,marA 转录被 MarR 抑制,并通过水杨酸<sup>[17]</sup>等化合物的结合来解除抑制。AcrR 是 acrAB 操纵子的抑制子,由 acrR 基因编码<sup>[18]</sup>,能特异性抑制 acrAB 及其自身的转录<sup>[19-20]</sup>。此外,acrR 基因等的突变也可使 AcrAB-TolC 外排泵过度表达或活性增加<sup>[21-22]</sup>。acrA 和 tolC 转录水平增高与大肠埃希菌对季铵盐化合物及氟喹诺酮类抗菌药物的耐药性增强有关<sup>[3]</sup>。

本研究中,5 株诱导株对苯扎溴铵的 MIC 显著增高;加入外排泵抑制剂后苯扎溴铵的 MIC 值下降 50.00%~99.61%,其中 5 株诱导株较其亲代下降 50.00%以上,表明外排泵在介导大肠埃希菌对季铵盐化合物的耐药中起重要作用,且诱导株中的作用更显著。在 5 株对苯扎溴铵敏感性下降的诱导株中,4 株菌 marA 基因的表达增加显著,较其亲代增高 17~33 倍,表明外排泵的过表达与 marA 的高表达存在一定关联;1 株表达下降,可能存在其他外排泵的调节机制或外排泵基因本身的突变导致外排泵表达增加。4



株诱导株 marR 基因表达增加,但增高的幅度低于 marA 基因。序列对比显示,各诱导株与其亲代相比 marR 基因存在不同的核苷酸突变并导致氨基酸替换,表明 marR 基因的失活突变(缺失、插入、移码、无义突变)以及参与靶 DNA 结合的 MarR 残基中的单个氨基酸亚基突变,可能会导致 MarR 的抑制作用减弱。此外,MarR 二聚体结合到的 marRAB 操纵子操纵区的突变<sup>[23-26]</sup>也会导致 MarR 转录抑制解除使 marRAB 操纵子转录增加,随后 AcrAB-TolC 外排泵表达上调,可能在这些菌株中 MarR 对外排泵基因的调控作用弱于 MarA。各菌株诱导前后 marA、soxS 和 rob 基因均存在多处突变,且突变位点分散,诱导株中未发现相同位置的核苷酸突变,因此推测这些散在的突变与本实验中季铵盐化合物抗性的增加无关。

综上所述,本研究中季铵盐化合物对大肠埃希菌的抗性产生与细菌外排泵的作用相关。marA 转录增加致外排泵 AcrAB-TolC 的高表达与季铵盐化合物对大肠埃希菌的抗性产生有一定关系,其抗性产生和调控的分子机制尚待进一步研究。

#### 【参考文献】

[1] Gerba CP. Quaternary ammonium biocides: efficacy in application [J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(2): 464-9.

[2] Mc Cay PH, Ocampo-Sosa AA, Fleming GT. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture[J]. Microbiology, 2010, 156(1): 30-8.

[3] 祁萌,李楠,代冰洁,等.季铵盐诱导大肠埃希菌外排泵 AcrAB-TolC 高表达与氟喹诺酮耐药性关系的研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2019,39(3):208-11.

[4] Chaidez C, Lopez J, Castro-del Campo N. Quaternary ammonium compounds: an alternative disinfection method for fresh produce wash water[J]. J Water Health, 2007, 5(2): 329-33.

[5] 曾杨梅,杨森,段培强,等.苯扎溴铵及土霉素诱导大肠埃希菌耐药株 AcrAB-TolC 外排泵调控基因变异研究[J].中国兽医杂志,2016,52(3):13-4.

[6] 温见翔,杨虹.四种外排泵抑制剂逆转阴沟肠杆菌耐药性效果比较[J].山东医药,2016,56(2):64-5.

[7] 张豪杰,孙阳,刘奉云,等.志贺菌膜孔蛋白 OmpF 及调控基因 micF 介导多重耐药机制的研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2016,36(9):690-86.

[8] Mc Carlie S, Boucher CE, Bragg RR. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance[J]. Drug Resist Updat, 2020, 48: 100672.

[9] Nove M, Kincses A, Molnar J, et al. The role of efflux pumps and environmental pH in bacterial multidrug resistance[J]. In Vivo, 2020, 34(1): 65-71.

[10] Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon JA, et al. Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants[J]. Microorganisms, 2016, 4(1): E14.

[11] Gupta A, Fuentes SM, Grove A. Redox-sensitive marR homo-

logue BifR from *Burkholderia thailandensis* regulates biofilm formation[J]. Biochemistry, 2017, 56(17): 2315-27.

[12] 高海娇,程古月,王玉莲,等.细菌主要外排泵及其调控蛋白研究进展[J].畜牧兽医学报,2017,48(11):2023-33.

[13] Demple B. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* SoxRS oxidative stress regulon—a review[J]. Gene, 1996, 179(1): 53-7.

[14] Azam TA, Ishihama A. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity[J]. J Biol Chem, 1999, 274(46): 33105-13.

[15] Rosenberg EY, Bertenthal D, Nilles ML, et al. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein[J]. Mol Microbiol, 2003, 48(6): 1609-19.

[16] Tavio MM, Aquili VD, Poveda JB, et al. Quorum-sensing regulator sdiA and marA overexpression is involved in in vitro-selected multidrug resistance of *Escherichia coli* [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(6): 1178-86.

[17] Seoane AS, Levy SB. Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1995, 177(12): 3414-9.

[18] Su CC, Rutherford DJ, Yu EW. Characterization of the multidrug efflux regulator AcrR from *Escherichia coli* [J]. Biophys Res Commun, 2007, 361(1): 90.

[19] Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria [J]. Drugs, 2004, 64(2): 204-159.

[20] Ma D, Alberti M, Lynch C, et al. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of acrAB genes of *Escherichia coli* by global stress signals[J]. Mol Microbiol, 1996, 19(1): 101-12.

[21] Webber MA, Talukder A, Pidcock LJ. Contribution of mutation at amino acid 45 of AcrR to acrB expression and ciprofloxacin resistance in clinical and veterinary *Escherichia coli* isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(10): 4390-2.

[22] Maneewannakul K, Levy SB. Identification for mar mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(7): 1695-8.

[23] Pidcock LJ. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998[J]. Drugs, 1999, 58(Suppl 2): 11-8.

[24] Oethinger M, Podglajen I, Kern WV, et al. Overexpression of the marA or soxS regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(8): 2089-94.

[25] Alekshun MN, Kim YS, Levy SB. Mutational analysis of MarR, the negative regulator of marRAB expression in *Escherichia coli*, suggests the presence of two regions required for DNA binding[J]. Mol Microbiol, 2000, 35(6): 1394-404.

[26] Komp Lindgren P, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(10): 3222-32.