

銀染色を用いた一本鎖 DNA 高次構造多型解析による 黄色ブドウ球菌 *gyrA* 遺伝子の点変異の検出

徳 江 豊・菅 野 康 吉

国立がんセンター中央病院臨床検査部*

(平成 5 年 9 月 28 日受付・平成 5 年 12 月 20 日受理)

黄色ブドウ球菌におけるキノロン薬耐性と *gyrA* 遺伝子の点変異との関連を明らかにし、*gyrA* 遺伝子の点変異の簡便な同定法の開発およびその有用性を確かめる目的で、36 株の臨床分離黄色ブドウ球菌 (キノロン耐性菌 29 株・感受性菌 7 株) の *gyrA* 遺伝子を polymerase chain reaction (PCR) で増幅し、放射性物質 (RI) を使用しない一本鎖 DNA 高次構造多型 Single Strand Conformation Polymorphism (Non-RI SSCP) 法で変異の有無を検討した。同時に PCR で増幅した DNA 断片を直接塩基配列決定法で解析した。その結果、キノロン耐性と関連する 4 種類の *gyrA* 遺伝子の点変異が認められた。すなわち (1) Ser-84→Leu; (2) Ser-85→Pro; (3) Glu-88→Gly; および (4) Glu-88→Lys である。このうち Glu-88→Gly の点変異は今までに報告のない変異であった。さらにアミノ酸コドン 86 の ATT→ATC 変異 (アミノ酸は変化しない) が 1 株のキノロン感受性菌に認められたが、これも今までに報告のない変異であった。2 種類の新しいタイプの二重点変異を含めた 7 種類の遺伝子変異株はすべて、遺伝子変異のない野生株と 1 回の Non-RI SSCP 法による電気泳動にて判別可能であった。以上より、この Non-RI SSCP 法はキノロン薬耐性と関連する *gyrA* 遺伝子の点変異の有無とともにその変異型の推定まで可能な新しい同定法であり、迅速、簡便、かつ有用性の高い検査法と考えられた。

Key words: Non-RI SSCP, PCR, quinolone resistance, *gyrA* gene, *Staphylococcus aureus*

ブドウ球菌、特に methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) による感染症は有効な薬剤が少ないことから临床上重要な問題となっている¹⁾。オフロキサシンやシプロフロキサシンをはじめとするニューキノロン薬は MRSA 感染症にも有効とされていたが²⁾、近年ニューキノロン薬に耐性を示す菌株の増加傾向が認められ、特にブドウ球菌において著しいと報告されている^{3,4)}。これまでに、キノロン薬の耐性機序として 3 種類のメカニズムが報告されている。第 1 の機序は、*norA* 遺伝子に支配されている、細胞質膜上に存在する膜蛋白による、キノロン薬の菌体外排出機構 (active efflux) である⁵⁾。第 2 番目は、その作用機序は不明であるが *cfx-ofx* と命名された遺伝子領域によるものである⁶⁾。第 3 のメカニズムはキノロン薬の標的酵素と考えられている、細菌細胞内において DNA の複製に関わる DNA ジャイレース⁷⁾の構造変化である⁸⁻¹¹⁾。大腸菌では DNA ジャイレースは 2 個の A サブユニットと 2 個の B サブユニットで構成された四量体構造をしており、それぞれ *gyrA* および *gyrB* 遺伝子に支配されている。

高度キノロン薬耐性と関係しているのは主に *gyrA* 遺伝子の点変異であるとされ、ブドウ球菌においてもいくつか報告されている⁸⁻¹¹⁾。今までに、シプロキサシン耐性のブドウ球菌から同定された点変異は、Ser-84→Leu; Ser-84→Ala; Ser-85→Pro; Glu-88→Lys の 4 種類である。

一方、点変異の同定法としては種々の方法が報告されている。点変異の塩基配列に特異的なオリゴヌクレオチドをプローブとして行うハイブリダイゼーション法⁹⁾、直接塩基配列決定法⁸⁾、制限酵素の認識部位の DNA 多型を検出する restriction fragment length polymorphism (RFLP)^{10,11)} などである。これらの方法は有用であるけれども、一般の臨床検査で使用する方法としてはそれぞれ問題点があった。一本鎖高次構造多型 single strand conformation polymorphism (SSCP) 解析法は^{12,13)}、一本鎖 DNA が塩基配列にもとづいて形成する高次構造の違いを電気泳動の移動度の差として検出するものであり、点変異の簡便な同定法である。しかし検出に RI を使用していたことから、オートラジオグラフィに数日を要するという欠点があった。

* 東京都中央区築地 5-1-1

最近、RIを使用せず銀染色により判定することでその問題を解決した新しい検出法 (Non-RI SSCP) が開発された¹⁴⁾。今回、我々はこの Non-RI SSCP 法をキノロン薬耐性と関係の深いジャイレース A 蛋白のコドン 84~88 における点変異の判定に応用し、あわせてそれぞれの点変異の塩基配列を決定し、その有用性を確かめたので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

国立がんセンター中央病院と東北大学加齢医学研究所内科において、臨床検査材料から分離された 36 株の *S. aureus* を実験に用いた。

2. 抗菌力測定

セプターテストパネル (日本ベクトンディッキンソン株式会社) による微量液体培地希釈法を用いて MIC を測定した。シプロフロキサシン耐性とオフロキサシン耐性は、それぞれ MIC が 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上として判定した。

3. DNA の抽出

使用菌株からの染色体 DNA の抽出は、すでに報告した方法に従った¹⁵⁾。

4. オリゴヌクレオチドの合成

プライマーとして使用したオリゴヌクレオチドは、*S. aureus gyrA* 遺伝子の塩基配列¹⁶⁾にもとづき設計し、インターテック株式会社に合成依頼し購入した。それらの塩基配列は Fig. 1 に示した。ニューキノロン薬耐性は *gyrA* 遺伝子アミノ酸コドン 84 から 88 の

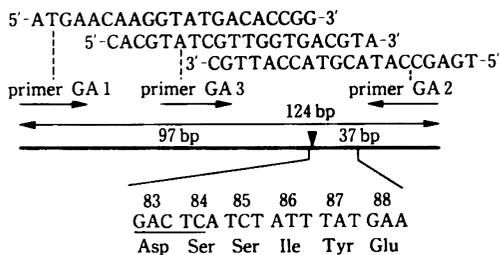


Fig. 1. Primers for polymerase chain reaction and direct DNA sequencing. A pair of primers (GA 1 and GA 2) yield a product of 124-bp *gyrA* fragment after PCR amplification. The presence of a *Hin* I site (wild type) generates a pair of *Hin* I DNA fragments 97 and 37 bp in size, whereas its absence because of mutation yields a 124-bp fragment. Underlining denotes a *Hin* I site (GANTC), and numbers identify the positions of the deduced amino acid residues. Primer GA 3 was used as a sequencing primer.

部位と関連があることが知られているため、この部位を増幅するようにプライマーを設計した。プライマー GA 1 と GA 2 により 124 bp の PCR 産物が得られる。GA 3 は塩基配列決定用のプライマーとして用いた。

5. PCR

反応は、DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus) を用い、反応条件は denature 94°C, 30 秒, annealing 60°C, 30 秒, extension 72°C, 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル増幅した。

6. RFLP

PCR 産物を制限酵素 *Hin* I にて 37°C 1 時間消化した後、12% アクリルアミドゲル内電気泳動し、ethidium bromide 染色し紫外線ランプ下で観察した。

7. SSCP

PCR 産物 1 μl に対して 10 μl の 95% ホルムアミドを含む loading 溶液を加え、80°C 5 分間 denature した後、12% アクリルアミドゲル (30:1 アクリルアミド: ビスアクリルアミド) に 10 μl を apply し、25 mM トリス, 192 mM グリシンを含む buffer を用いて 200 V 2 時間電気泳動した。冷却循環恒温槽を利用しゲルの温度が 17°C で一定になるよう電気泳動した。泳動終了後ただちにゲルをトレイに移し、銀染色試薬 (第一化学) を用いてバンドを検出した。

8. 塩基配列の決定

PCR で増幅した DNA 断片の直接塩基配列決定は、T4 ポリヌクレオチドキナーゼと [γ -³²P] ATP¹⁷⁾ およびプライマー GA 3 を用いてサイクルシーケン法¹⁸⁾で行った。サンプルは 7 M 尿素を含む 6% アクリルアミドゲルにて、1,800 V 2 時間泳動し乾燥後オートラジオグラフィーを行った。

II. 結果

今回の実験に使用した *S. aureus* 36 株のうち、29 株がオフロキサシンとシプロフロキサシンともに耐性であった。キノロン剤耐性と関係する *gyrA* 遺伝子のアミノ酸の変化は、アミノ酸番号 84 番目のセリン (Ser-84) から 88 番目のグルタミン酸 (Glu-88) までの領域と報告されているので、その領域が増幅されるようにプライマーを設定した (Fig. 1)。PCR によりすべての菌から予想された 124 bp の DNA 断片が得られた。84 番目のアミノ酸をコードする *gyrA* 遺伝子の点変異の有無は、PCR 産物を制限酵素 *Hin* I で処理することにより判定した。すなわち Fig. 1 の下線で示した *Hin* I 切断部位が存在すると、97 bp と 37 bp の大きさの 2 つの DNA 断片が得られるが、点変異により *Hin* I 切断部位が変化すると 124 bp の DNA 断片のみとなる。検討した 36 株のうち、14

株は *Hin*fl 処理で 2 つの DNA 断片が得られた (Fig. 2 A)。これらの株のうち 7 株はキノロン耐性であり、88 番目のアミノ酸をコードする *gyrA* 遺伝子の部位に点変異を有する変異株であった (Table 1)。

それぞれの分離菌を Non-RI SSCP 法で分析したところ、その泳動度の差により 8 種類に分類された (Fig. 2 B)。本実験の条件下では、一部再結合した二本鎖 DNA (124 bp のサイズのパンド) と isoconformer (同じ塩基配列で泳動度がわずかに異なった近いパンド) が認められた。それぞれの泳動パターンで各 2 株 (ただしコドン 86 の変異株は 1 株) の計 15 株を、直接塩基配列決定法により検討したところ、これらの泳動パターンの変化はすべて *gyrA* 遺伝子の点変異と関係しており、同じ泳動パターンの株では点変異も同一であった (Fig. 3)。Table 1 に示したように、耐性株における *gyrA* 遺伝子の点変異は 84, 85, 88 番目のアミノ酸コドンに存在しており、二重点変異も加えると 6 種類の変異パターンが検出された。コドン 84 の変異は C→T transision で 22 株に見られた。コドン 85 の変異は 2 株に見られ T→C transision であった。一方コドン 88 に見られた変異は GAA→GGA または GAA→AAA の transision であった。キノロン耐性 29 株のうち 23 株は 1 か所のみの変異であり、他の 6 株は 2 か所に点変異が認められた。コドン 84 と 85 の二重点変異が 2 株でコドン 84 と 88 の二重点変異が 4 株で検出された。キノロン感受性株の 1 例にコドン 86 の ATT→ATC 変異が認められたが、同じアミノ酸をコードしている silent mutation であった。6 株は遺伝子に変異のない野生型でキノロン感受性であった。

III. 考 察

キノロン薬の作用機作および耐性機構は、はじめ大腸菌の研究で解明されてきた。その結果から推定され *S. aureus* の *gyrA* 遺伝子もクローン化され、その塩基配列も明らかにされた¹⁶⁾。今回我々は、36 株の *S. aureus* を Non-RI SSCP 法で解析した結果、キノロン薬耐性と関連する 6 種類の変異を明らかにした。この中、(1) コドン 84 の TCA→TTA; (2) コドン 85 の TCT→CCT; (3) コドン 88 の GAA→AAA はすでに報告されているタイプと同様であった⁸⁾。それらに加えて (4) コドン 88 の GAA→GGA; (5) コドン 84 の TCA→TTA とコドン 88 の GAA→AAA の二重点変異; (6) コドン 84 の TCA→TTA とコドン 88 の GAA→GGA の二重点変異は今までに報告のないものであった。さらに、キノロン薬感受性の 1 株においてコドン 86 の ATT→ATC という新しい点変

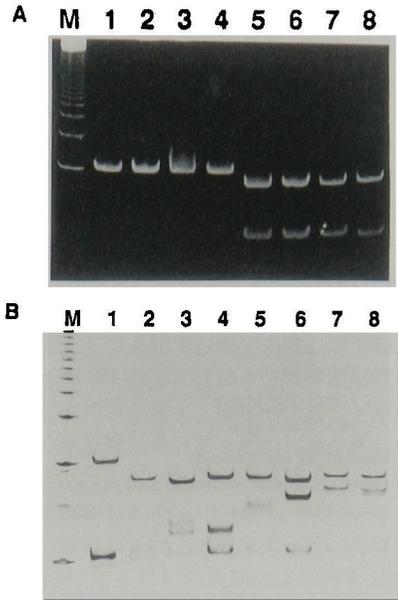


Fig. 2. A, Polyacrylamide gel analysis of PCR-amplified DNA digested with *Hin*fl. PCR products were digested with *Hin*fl at 37°C for 1 h and subjected to electrophoresis through 12% polyacrylamide gel at 20 mA for 40 min and subsequent ethidium bromide staining. B, Detection of *gyrA* mutation by Non-RI SSCP analysis. Eight types of bands with different mobilities were separated. In all lanes, renatured ds DNAs appeared at positions of 124 bp in size. Lanes: M, molecular weight standards of 123 bp ladder plasmid DNA (GIBCO BRL); lane 1, mutant with Ser→Leu (TCA→TTA) at codon 84 and Ser→Pro (TCT→CCT) at codon 85; lane 2, mutant with Ser→Leu (TCA→TTA) at codon 84; lane 3, mutant with Ser→Leu (TCA→TTA) at codon 84 and Glu→Gly (GAA→GGA) at codon 88; lane 4, mutant with Ser→Leu (TCA→TTA) at codon 84 and Glu→Lys (GAA→AAA) at codon 88; lane 5, wild type; lane 6, mutant with Glu→Gly (GAA→GGA) at codon 88; lane 7, mutant with Glu→Lys (GAA→AAA) at codon 88; lane 8, mutant with ATT→ATC at codon 86 (silent). Lanes 1 through 4, 6 and 7 were quinolone resistant strains.

Table 1. Mutations of the *gyrA* gene in *Staphylococcus aureus* detected by Non-RI SSCP

Codon	Nucleotide	Amino acid	<i>Hinf</i> I ¹⁾	No. ²⁾
Resistant strain ³⁾				
84 and 85	TCA, TCT→TTA, CCT	Ser, Ser→Leu, Pro	-	2
84	TCA→TTA	Ser→Leu	-	16
84 and 88*	TCA, GAA→TTA, GGA	Ser, Glu→Leu, Gly	-	2
84 and 88*	TCA, GAA→TTA, AAA	Ser, Glu→Leu, Lys	-	2
88*	GAA→GGA	Glu→Gly	+	2
88	GAA→AAA	Glu→Lys	+	5
Susceptible strain				
86*	ATT→ATC	Ile→Ile	+	1
None			+	6

* novel mutation

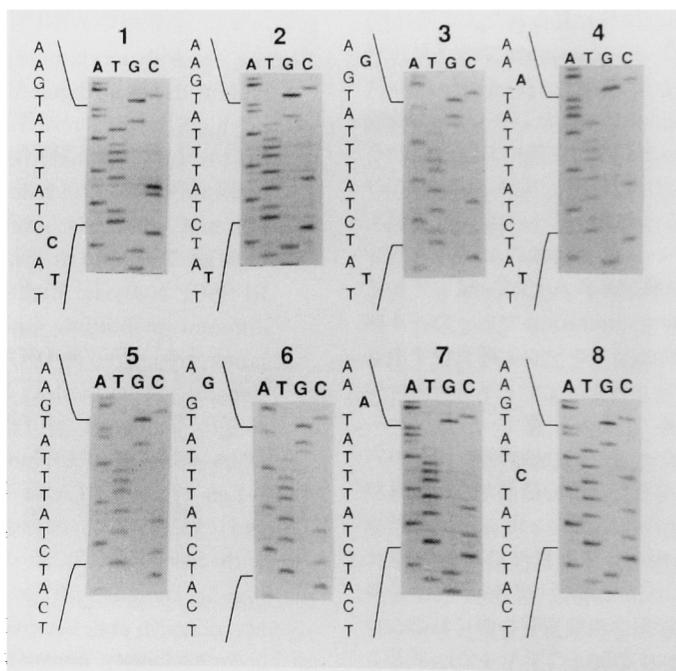
¹⁾ +, *Hinf* I site present-, *Hinf* I site absent²⁾ number of occurrences³⁾ resistant to ciprofloxacin and ofloxacin
susceptible to ciprofloxacin and ofloxacin

Fig. 3. Mutations in the *gyrA* gene from clinical isolates identified on DNA sequencing gels. PCR-amplified DNA was sequenced by the cycle sequencing method. The numbers at the top of the gels correspond to those of lanes shown in Fig. 2 A and 2 B. No.5 shows a sequence of wild type, whereas the others have either one or two base substitutions at codons 84 through 88.

異を認めた。この変異はコードするアミノ酸には変化のない silent mutation であった。これらの7種類の変異株は Fig. 2 B に示すように、Non-RI SSCP 法では1回の泳動で判別され、その変異型まで推定可能であった。今回の検討では、既知のコドン84の TCA(Ser)→GCA(Ala)の点変異を持つ mutant が認められなかったので、site-directed mutagenesis の方法¹⁹⁾を用いてその mutant を作製し、同様な条件下で Non-RI SSCP 法を施行したところ、他の8種類と明瞭に区別できた(データは示さず)。今回の実験では種々の実験条件、例えばゲルの濃度、バッファの組成、電圧、温度等を変えて泳動を行った結果、それぞれのパターンの差がもっとも明らかに区別可能となるように条件を設定した。SSCP 法では理論的には2本のバンドとして検出されるはずであるが、本条件下では再結合した二本鎖 DNA と isoconformer が認められた。しかし、目的以外の DNA の混入の可能性は、同じサンプルをより高温で泳動すると isoconformer が消失して2本のバンドとして検出可能になること(ただしそれぞれのパターンの差が少なくなってしまう)、Fig. 2 A, Fig. 3 でも目的以外のバンドがないことにより否定されることが考えられる。

米国における報告と同様に、日本においてもキノロン薬耐性株の約半数は、コドン84の TCA→TTA の点変異を有する変異株であった。この変異はキノロン薬耐性においてもっとも一般的でかつ重要な変化と言えよう。今回の研究は、キノロン薬耐性と *gyrA* 遺伝子のコドン84~88の部位の点変異とが深く関連しているという理論にもとづいており、実際、検討した29株の耐性株すべてはこの領域に少なくとも1か所の点変異を保有していた。ただし、我々は遺伝子の一部の領域のみ塩基配列を決定したので、他の領域に変異の存在する可能性は否定できない。しかし今回の検討で、*gyrA* 遺伝子のコドン84~88の部位の点変異とキノロン薬耐性との関連が密接であることがより明確となった。

一方、疫学的観点からみても *S. aureus* におけるこの特異的な点変異を知ることは有用であろう。すなわち MRSA の院内感染の感染源、感染経路を特定するための疫学的指標として、ファージ型、コアグラーゼ型、薬剤耐性パターン、プラスミド DNA プロフィール、リボタイプ、パルスフィールド電気泳動等が報告されてきた²⁰⁻²³⁾。そのうちでも分子生物学的手法を用いた DNA 解析は菌株間の異同をみるのに優れていると考えられているが、Non-RI SSCP 法による解析は迅速で簡便なうえ、一度に多数の検体を分析でき

る。1か所の検討のみで8種類に分類可能であったことから、いくつかの変異の分類を組み合わせることによりさらに分離株の異同の判定が可能となろう。Non-RI SSCP 法によるゲノタイプの分類は、MRSA をはじめとする院内感染の発生源、伝達経路、伝播の解析において有力な方法と期待される。電気泳動のパターンはそれぞれの点変異に特徴的なため、既知の変異については DNA の移動度の比較のみでその変異型まで推定可能である。しかも未知の変異においても、比較的簡便に直接塩基配列決定できるため変異株のスクリーニングとしても利用可能である。以上述べてきたように、Non-RI SSCP 法はキノロン薬耐性の点変異同定法としてのみならず、疫学的研究の一手段としても有用な、検査室においても利用可能な新しい検査方法と言えよう。

謝 辞

本研究の一部は第4回上田記念感染症・化学療法研究奨励賞(1993年6月)の援助により行われた。同賞の受賞対象となった研究は、東北大学抗酸菌病研究所(現、加齢医学研究所)において行われたものであり共同研究者である渡辺彰博士、庄司聡先生に感謝致します。

文 献

- 1) Lyon B R, Skurray R: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* genetic basis. *Microbiol Rev* 51: 88~134, 1987
- 2) Chin N X, Nue H: Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 25: 319~326, 1984
- 3) Humphreys H, Mulvihill E: Ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2: 383, 1985
- 4) Shalit I, Berger S A, Gorea A, Frimerman H: Widespread quinolone resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a general hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 593~594, 1989
- 5) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M: Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol* 172: 6942~6949, 1990
- 6) Trucksis M, Wolfson J S, Hooper D C: A novel locus conferring fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 173: 5854~5860, 1991
- 7) Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea M H, Nash H A: DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 3872~3876, 1976

- 8) Goswitz J J, Willard K E, Fasching C E, Peterson L R: Detection of *gyrA* gene mutations associated with ciprofloxacin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Analysis by polymerase chain reaction and automated direct DNA sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1166~1169, 1992
- 9) Fasching C E, Tenover F C, Slama T G et. al.: *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Indiana, Minnesota, and Tennessee. *J Infect Dis* 164: 976~979, 1991
- 10) Sreedharan S, Oram M, Jensen B, Peterson L R, Fisher L M: DNA gyrase *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarity with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 7260~7262, 1990
- 11) Sreedharan S, Peterson L R, Fisher L M: Ciprofloxacin resistance in coagulase-positive and -negative staphylococci: role of mutations at serine 84 in the DNA gyrase A protein of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2151~2154, 1991
- 12) Hayashi K: PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* 1: 34~38, 1991
- 13) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874~879, 1989
- 14) Sugano K, Kyogoku A, Fukayama N, Ohkura H, Shimosato Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and simple detection of c-Ki-ras 2 gene codon 12 mutations by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. *Lab Invest* 68: 361~366, 1993
- 15) Tokue Y, Shoji S, Satoh K, Watanabe A, Motomiya M: Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 6~9, 1992
- 16) Hopewell R, Oram M, Briesewitz R, Fisher L M: DNA cloning and organization of the *Staphylococcus aureus gyrA* and *gyrB* genes: close homology among gyrase proteins and implications for 4-quinolone action and resistance. *J Bacteriol* 172: 3481~3484, 1990
- 17) Evans M R, Read C A: ³²P, ³³P and ³⁵S: selecting a label for nucleic acid analysis. *Nature* 358: 520~521, 1992
- 18) Murray V: Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nuci Acid Res* 17: 8889, 1989
- 19) Hemsley A, Arnheim N, Toney M D, Cortopassi G, Galas D J: A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucl Acid Res* 17: 6545~6551, 1989
- 20) Archer G L, Mayhall C G: Comparison of epidemiological markers used in the investigation of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *J Clin Microbiol* 18: 395~399, 1983
- 21) Hall L M C, Jordens J Z, Wang F: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from China characterized by digestion of total DNA with restriction enzymes. *Epidemiol Infect* 103: 183~192, 1989
- 22) Zuccarelli A J, Roy I, Harding G P, Couperus J J: Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 26: 97~102, 1990
- 23) Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K, Kato N, Takeuchi J: Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 29: 2690~2695, 1991

Detection of *gyrA* mutations in *Staphylococcus aureus* by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis

Yutaka Tokue and Kokichi Sugano

Division of Clinical Laboratory, National Cancer Center Hospital,

1-1, Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

Thirty-six clinical isolates of *Staphylococcus aureus* (twenty-nine fluoroquinolone-resistant strains and seven susceptible strains) were studied for the presence of point mutations of the *gyrA* gene by non-radioisotopic single-strand conformation polymorphism (Non-RI SSCP) analysis using silver stain. Direct DNA sequencing analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified DNA fragments confirmed the results obtained by Non-RI SSCP analysis and revealed that fluoroquinolone resistance is closely associated with six types of mutations in the *gyrA* gene, three of which were newly identified (one point mutation and two double point mutations): Ser-84→Leu and Glu-88→Gly; Ser-84→Leu and Glu-88→Lys; and Glu-88→Gly. Furthermore, a novel ATT→ATC mutation at codon 86 (silent mutation) was seen in only one fluoroquinolone-susceptible strain. All of these seven mutational types were separated from the wild type in a single electrophoretic run within 3 h after PCR amplification. Thus we conclude that this new technique is a rapid, simple and useful screening method for the genotyping of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance.