文章编号: 1001-0580(2007)12-1494-02 中图分类号: R 138.1 文献标志码: A 【实验研究】

志贺菌外排泵 cmr 基因克隆及耐药作用

吴健[1,2],张少平[2],任存邦[2],崔巍[2],郗园林[1],段广才[1]

摘 要: 目的 研究志贺菌外排泵 *cmr* 基因的耐药作用。**方法** 以志贺菌临床多耐药株 H_{24} 基因组为模板,扩增出含 *cmr* 基因的 1620 bp DNA 片段,将所得片段与 pMD18 - T 载体连接,转化到大肠埃希菌 DH5α 中,酶切鉴定阳性克隆,对其进行序列测定并用琼脂平皿二倍稀释法对重组菌株进行药敏测试和泵抑制剂实验。**结果** 含有志贺菌 *cmr* 基因的大肠埃希菌较不含有该大肠埃希菌对红霉素和四环素的耐药性提高 1 倍,并且这种耐药性提高可被质子泵抑制剂氰氯苯腙(CCCP)所抑制。**结论** *cmr* 基因与志贺菌耐药株 H_{24} 对红霉素和四环素的耐药性相关。

关键词: 志贺菌; *cmr* 基因; 外排泵; 耐药

Antibiotic resistance function of active efflux pump gene cmr **from** Shigella

WU Jian, ZHANG Shao-ping, REN Cun-bang, et al. College of Public Health, Zhengzhou University (Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To study the function of active efflux pump gene *cmr* in clinical isolates of Shigella. **Methods** The active efflux pump gene *cmr* of Shigella sonnei H_{24} was amplified by PCR and ligated with pMD18 - T to construct the recombinant plasmid pMD - *cmr*, and the pMD - *cmr* was transformed into E. coli DH5α. The positive recombinant plasmid was identified by restriction enzyme digestion and the gene was sequenced and analyzed. Drug susceptibility of the recombinant strain was tested by the two fold agar dilution technique; The MICs of the seven antibiotics were also determined by adding CCCP. **Results** The E. coli strain with *cmr* gene was more resistant to tetracycline and erythromycin than the strain without it, and the resistances could be inhibited by proton pump inhibitor CCCP. **Conclusion** The gene *cmr* is related with the resistance of tetracycline and erythromycin in the drug resistant - strain H_{24}.

Key words: shigella; *cmr*; gene; active efflux pump; antibiotic resistance

志贺菌属 (Shigella) 细菌是主要肠道病原菌之一,是人类及灵长类动物细菌性痢疾的致病菌,能引起感染性腹泻,在发展中国家其发病率和病死率较高。近年研究发现,病原菌主动外排机制(active efflux)在耐药机制中占有重要地位。因为外排泵系统广泛存在,它不仅介导了众多革兰阴性菌与革兰阳性菌对多类抗生素的耐药性,而且参与真菌的耐多药性[1]。外排泵 *cmr* 基因属于主易化超家族(MFS),是广泛存在于细菌乃至真核生物的耐多药泵家族[2,3]。本研究克隆了临床耐药志贺菌 H_{24} 的包括其调控序列在内的完整 *cmr* 耐药泵基因,并对其进行了异源表达,对其在大肠埃希菌中产生的耐药作用进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 菌种及质粒: 大肠埃希菌 DH5α, 志贺菌临床分离耐药株 H_{24} 等(郑州大学公共卫生学院流行病教研室保存); 大肠埃希菌药敏质控株 ATCC25922 (河南省疾病预防控制中心惠赠); 质粒 pMD18 - T(日本 TaKaRa 公司)。(2) 工具酶及试剂: Pst Ⅰ内切酶、Kpn Ⅰ内切酶、胰 RNA 酶、DNA 回收试剂盒(日本 TaKaRa 公司); 7 种抗生素(中国药品生物制品检定所); 酵母提取物和蛋白胨(美国 Oxiod 公司); 质子泵抑制剂氰氯苯腙(CCCP, 美国 Sigma 公司); 营养肉汤水解酪蛋白(MH)培养基(北京奥博星公司)。

1.2 方法

1.2.1 志贺菌临床耐多药株筛选 用 MH 培养基琼脂平皿二倍稀释法,测定临床收集的 30 株志贺菌耐药株对四环素、氯霉素、红霉素、庆大霉素、环丙沙星、硫酸链霉素、硫酸新霉素的最低抑菌浓度(Minimum Inhibition Concentration, MIC); 标准控制菌为 ATCC25922。

1.2.2 志贺菌基因组 DNA 提取 按常规方法进行[4]。

1.2.3 志贺菌临床株耐多药株 *cmr* 基因片段获取 (1) 扩增: 从 GenBank 查到志贺菌 *cmr* 基因序列,利用 Primer 5.0 设计引物。引物设计位点使克隆出的片段包含有 *cmr* 基因的调控序列,正向连接与 lac 启动子相隔约 200 bp,希望用自身启动子表达[5]。引物由北京赛百盛公司合成。上游引物 P1 为: GGGGTACCGCGTCGCGTTAATAAGAG, 下游引物 P2 为: GGCTGCAGGCGTAGGTGAAGGGATGG; 以志贺菌临床多耐药株 H_{24} 为模板,以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 条件为: 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 40 s, 58 ℃ 45 s, 72 ℃ 120 s, 30 个循环, 72 ℃延伸 10 min。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。(2) 目的片段回收: PCR 产物计 50 μl, 1 % 琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 快速回收试剂盒回收,方法参考产品说明书。

1.2.4 pMD - *cmr* 重组质粒构建 回收的目的片段与 pMD18 - T 载体在 16 ℃下连接过夜。用连接好的质粒转化大肠埃希菌 DH5α, 涂布于含 80 μg/ml Amp 的 LB 琼脂平板上, 37 ℃培养过夜后,利用蓝白斑筛选挑取少许白色单克隆,在含 100 μg/ml Amp 的 LB 液体培养基中培养过夜; 碱裂解法从菌液中提取质粒,用 Pst Ⅰ单酶切和 Kpn Ⅰ和 Pst Ⅰ双酶切进行鉴定。

1.2.5 pMD - *cmr* 重组菌株耐药性检测及氰氯苯腙对其耐药性影响 以转入 pMD18 空质粒(自连接)的 DH5α 菌为对照,采用琼脂平皿二倍稀释法测定 7 种抗生素对 pMD - *cmr* 重组菌株的最低抑菌浓度(MIC)。另外在含抗生素琼脂培养基中加入氰氯苯腙至 20 μmol/l, 再次检测定细菌 MIC 值。

1.3 序列测定及分析 取酶切鉴定正确的重组质粒进行纯化并由上海生工生物工程有限公司测序。

2 结 果

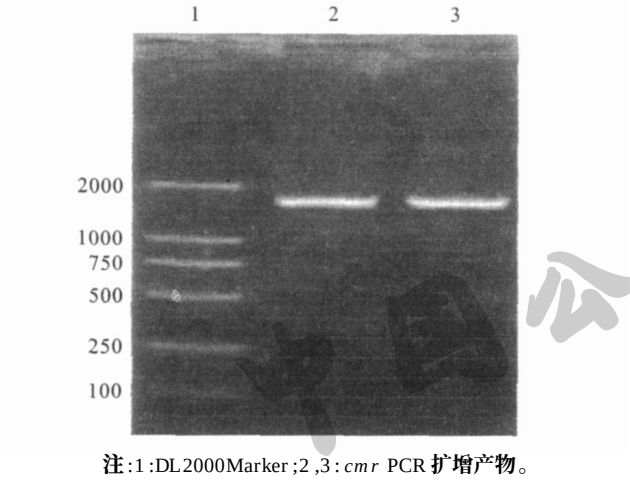
2.1 耐药株筛选 在 MH 培养基上用琼脂平皿二倍稀释法

作者单位: 1. 郑州大学公共卫生学院,郑州 450052; 2. 郑州大学生物工程系
作者简介: 吴健(1961 -),男,江苏宜兴人,教授,硕士,主要从事微生物耐药机制、微生物代谢工程研究。
通讯作者: 段广才

筛选出的宋氏志贺菌耐多药株 H_{24},对 7 种抗生素均呈不同程度耐药,其中对氯霉素、红霉素、四环素和硫酸链霉素的 MIC 值分别为 64,128,128,64,均呈高度耐药,对环丙沙星、硫酸新霉素和庆大霉素等的 MIC 值分别为 0.25,16,0.25,呈轻度耐药。

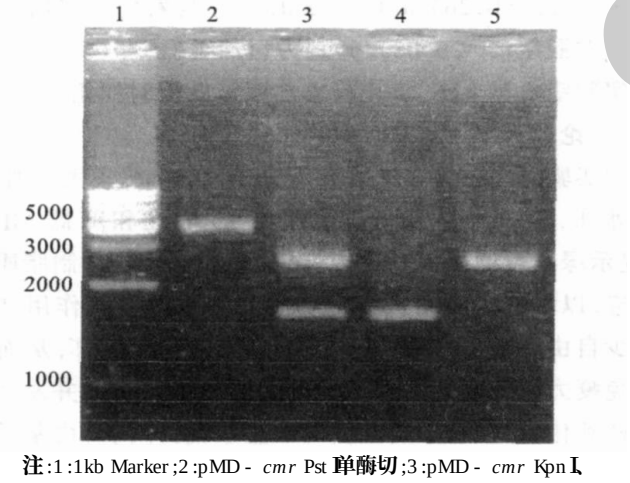
2.2　*cmr* 基因扩增　PCR 扩增宋氏志贺菌 H_{24} *cmr* 基因,扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析,在约 1 620 bp 处有一特异扩增条带,分子量大小与预期扩增值相符(图 1)。

2.3　pUC-*cmr* 重组质粒鉴定　经 Pst Ⅰ单酶切和 Kpn Ⅰ、Pst Ⅰ双酶切鉴定,确认获得正确的重组质粒(图 2)。



注:1:DL2000Marker;2,3:*cmr* PCR 扩增产物。

图 1　cmr PCR 扩增产物(1600bp)



注:1:1kb Marker;2:pMD-*cmr* Pst 单酶切;3:pMD-*cmr* Kpn Ⅰ、Pst Ⅰ双酶切;4:*cmr* PCR 扩增;5:pMD18-T 质粒。

图 2　pMD-cmr 重组质粒酶切鉴定

2.4　重组大肠埃希菌耐药性及氰氯苯腙的影响(表 1)

表 1　重组菌株 pMD-cmr 的最低抑菌浓度(MIC,μg/ml)

抗生素	未加入氰氯苯腙		加入氰氯苯腙	
	pMD-*cmr*(DH5α)	pMD18-T(DH5α)	pMD-*cmr*(DH5α)	pMD18-T(DH5α)
氯霉素	4	4	0.5	0.5
红霉素	32	16	2	2
环丙沙星	0.0156	0.0156	0.00781	0.00781
四环素	8	4	1	1
硫酸链霉素	4	4	0.25	0.25
庆大霉素	0.5	0.5	0.25	0.25
硫酸新霉素	2	2	0.25	0.25

由表 1 可见,携带有重组 pMD-*cmr* 质粒的菌株与携带空质粒的菌株比较耐药性有所增强。对四环素和红霉素的 MIC 值提高了 1 倍,显示该基因有增强细菌耐药性的作用。加入氰氯苯腙后,各抗生素对 2 种菌株的 MIC 值均有不同程度下降。

2.5　测序结果序列分析　测序结果显示,志贺菌临床耐药株 H_{24} 与 Genbank 报道的宋氏志贺菌标准株 *cmr* 基因相比,碱基序列完全一致,并未发现有基因突变。

3　讨　论

主动外排耐药系统可分为 5 个家族。1998 年 Anidy 等发现志贺菌中存在主动外排机制[5],国内杨海燕等证实志贺菌存在 Acrab-Tolc 耐药泵[6]。

本研究克隆出志贺菌临床耐药株 H_{24} 包括调控序列在内的 *cmr* 基因,并连接到 pMD18-T 载体上。*cmr* 带有自身的调控序列,而且距 pMD18-T 载体的 lac 启动子较远,*cmr* 可在自身启动子调控下进行表达,pMD18 质粒高拷贝的特点则可使 *cmr* 表达量升高。结果显示,通过最低抑菌浓度(MIC)比较,携带有 *cmr* 基因的重组菌株对红霉素和四环素的耐药性增高一倍,对其他抗生素则无变化。临床耐多药株 H_{24} 的 *cmr* 基因经测序分析,与宋氏志贺菌标准株比较并未发现基因突变,证实 *cmr* 基因介导的耐药与编码区基因的突变无关,而可能与 *cmr* 基因的表达量升高有关。

本文结果还显示,志贺菌临床耐药株 H_{24} 对四环素和红霉素的 MIC 值均为 128 μg/ml,但当该耐药株 *cmr* 基因在大肠埃希菌中表达后,对四环素和红霉素的耐药性仅提高了 1 倍,MIC 值分别为 8 和 32 μg/ml,表明志贺菌临床耐药株 H_{24} 对四环素和红霉素的耐药性除与 *cmr* 基因表达量升高相关外,可能还有其他耐药基因发挥作用,这可能是多基因、多种耐药机制共同作用的结果。

加入质子泵抑制剂氰氯苯腙后,重组株和对照株对上述 4 种抗生素的耐药性降低到同一水平,表明 *cmr* 外排泵是质子泵,它的高表达可导致菌株对上述 2 种抗生素的耐药性升高,但可被质子泵抑制剂氰氯苯腙所抑制。加入氰氯苯腙后,2 种菌株对 7 种抗生素的 MIC 值均有较大幅度下降,提示菌体中可能还有其他以质子梯度为能量的外排泵存在。

(鸣谢:本研究在河南省分子医学重点开放实验室完成)

参考文献

[1] 郝建华,戚焕贞. 常见革兰氏阴性菌的耐药机制[J]. 山东医药,2002,42(34):112.
[2] Ines M Borges-Walmsley, Kenneth S McKeegan, Adrian R Walmsley. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs[J]. Biochem, 2003, 376: 313-338.
[3] Rotem D, Sal-man N, Schuldine S. *In vitro* monomer swapping in Cmr, a multidrug transporter from *Escherichia coli*, reveals that the oligomer is the functional unit [J]. Biochem, 2001, 276(51): 48243-48249.
[4] 姜泊,张亚历,周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,1996:107-108.
[5] Kunihiko N, Akihito Y. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in escherichia coli [J]. Bacteriol, 2001, 183(20): 5803-5812.
[6] Ghosh A S, Ahamed J, Chauhan K K, et al. Involvement of an efflux system in high-level fluoroquinolone resistance of Shigella dysenteriae[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 242(1): 54-56.
[7] 杨海燕,段广才,郗园林. 主动外排系统 acrAB 在志贺菌中分布和表达[J]. 中国公共卫生,2005,21(6):685-687.

收稿日期:2007-04-19　(孔繁学编辑　张亚莲校对)