

MgrA 金黄色葡萄球菌原核表达的构建和鉴定

郭强忠,程态英,张肆鹏,李文郎,李 伟,谭卫民,王春燕

(广东省深圳市观澜人民医院检验科 518110)

摘要:目的 金黄色葡萄球菌耐药株扩增 mgrA 基因,构建原核表达载体 pSK950-MgrA 质粒,并在大肠杆菌中表达。方法 按金黄色葡萄球菌多重耐药转运蛋白 MgrA 的编码序列设计引物,以金黄色葡萄球菌基因组 DNA 为模板,扩增出基因 mgrA 中约 444cDNA 片段,将所得片段与 pSK950-MgrA 载体连接,转化到感受态 BL-21 筛选到阳性克隆。结果 从阳性克隆中提取质粒,质粒测序结果与文献报道一致,成功筛选到阳性克隆。结论 本实验成功构建 MgrA 温敏穿梭载体,为下一步研究 MgrA 的耐药性提供方便、廉价、特异性的研究工具。

关键词:葡萄球菌,金黄色; 基因表达; 基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.053

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)01-0109-02

近年来,临床革兰阳性菌的感染呈上升趋势,其中金黄色葡萄球菌感染占很大比例,而金黄色葡萄球菌的耐药性也越来越普遍,特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)几乎对所有抗生素均耐药,给治疗带来很大困难。金黄色葡萄球菌的耐药机制至少有 3 个方面:(1)编码 DNA 旋转酶 A 亚基和拓扑异构酶 N A 亚基基因(*gyrA* 和 *grIA*)的突变;(2)DNA 旋转酶 B 亚基(*gyrB*)的突变;(3)编码 NorA 蛋白的基因(*norA*)的超水平表达^[1-2]。近来的研究中又发现 1 种新的与金黄色葡萄球菌多药耐药性有关的基因 *mgrA*,它可从多个途径对耐药性进行调节。*mgrA* 基因及其编码蛋白 *mgrA* 基因结构的 *mgrA* 基因位于金黄色葡萄球菌染色体中,包含 444 bp 的碱基对,编码 147 个氨基酸的 MgrA 蛋白。研究发现,*mgrA* 高表达时,细胞壁合成蛋白 *pbp4* 基因的表达受影响,*pbp4* 被认为参与细胞壁的合成,影响肽聚糖的二级结构,与细菌的耐药性相关^[3]。连建奇等^[4]用高效液相分析表明,*mgrA* 基因敲除株细菌细胞壁的交联度明显降低,*pbp4* 的 mRNA 的量明显增加,因此,推测 *mgrA* 基因可能调控细胞壁合成基因。另外,*mgrA* 高表达时还可上调 *S. aureus* 荚膜多糖 8、核酸酶的转录,抑制蛋白 A、 α 毒素、脂肪酶、蛋白酶等的转录,因此认为 *mgrA* 基因是一个多功能调节基因。

1 材料与方法

1.1 材料 BL-21(DE3)菌株购自 Novagen 公司,耐药 *S. aureus* 临床株由湖南省人民医院临床医学研究所分子生物学实验室馈赠,2YT 培养基分别购自 Hyclone 公司和 Invitrogen 公司,DNARasin、T4 连接酶购自 Promega 公司,Taq DNA 聚合酶、Pst I、EcoR I 和 BamH I 核酸内切酶、DNA Marker、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 Takara 公司。pSK950 质粒载体购自 Invitrogen 公司。酶及主要试剂限制性内切酶、Ex Taq DNA 聚合酶、DNA Ligation Kit Ver. 2.0 购自 TaKaRa(大连)公司。PCR 引物由上海生工公司合成。

1.2 细菌培养基 2YT 培养基;蛋白胨,10 g/L 酵母粉,2 g/L 磷酸二氢钾,12.5 g/L 磷酸氢二钠。

1.3 DNA 测序 挑取的阳性克隆质粒 pSK950-MgrA,质粒测序送往 Invitrogen 上海公司。

1.4 方法 (1)引物设计及合成:据 NCBI Gene Bank 的

mgrA 基因序列(NC_009782),全长共 444 bp,使用 Primer5.0 软件设计合成引物,引物序列为 5' TGCA CTGCAG TGCA TTA TTT TTC CTT TGT T3',5'端、3'端斜体分别为 PstI、BamHI 内切酶黏性末端;合成负链序列为 5'GATA CCG TCC TTC TTC GCC TCT GTC GCTGCT TCT CAGCT 3'。(2)重组 pSK950 载体构建:以获得耐药 *S. aureus* 临床株经 2YT 培养基培养后,为进行 PCR 扩增,扩增体系取约 2 μ L 耐药 *S. aureus*,4 μ L 混合,0.5 μ L 高保真热启动 Tag 酶,加双蒸水补齐至 20 μ L 混匀。使用 ABI9700 PCR 仪器扩增,条件为:98 $^{\circ}$ C 4 min;98 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 1.9 s,72 $^{\circ}$ C 10 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。实验结束后,经琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物,并回收目的片段。将获得的 *mgrA* 片段和 pSK950 分别进行 PstI、BamHI 双酶切,回收酶切片段并用 T4 连接酶进行连接反应。将连接产物转化,过夜培养后挑取阳性菌落进行鉴定,最后将鉴定结果为阳性的样本送测序。(3)转化喹诺酮类药物敏感的 *S. aureus* 临床株:通过电穿孔温敏穿梭质粒 pSK950 电转化重组 pSK950 载体到喹诺酮类药物敏感的 *S. aureus* 临床株。脉冲电压为 200 V;时间常数为 5 s;次数为 6 次。

2 结 果

2.1 金黄色葡萄球菌耐药株经 MgrA 特异性引物 PCR 扩增后,扩增产物经 0.5% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示片段长度约 500 bp。选择扩增最亮的 3 号片段,经重组连接 pSK950 载体后,再将测序鉴定质粒扩增后构建原核表达载体,再转化采用带四环素抗性基因的 pSK950 载体,第 2 天挑取阳性克隆。将挑取的阳性克隆扩增培养,并提取质粒进行酶切鉴定,质粒扩增后测序。

2.2 电转化重组 pSK950 质粒到 *S. aureus* N315 和喹诺酮类药物敏感 *S. aureus* 临床株中,在 37 $^{\circ}$ C 含 5 μ g/mL 四环素的平板上培养,同时转化空质粒作为对照。挑取阳性克隆进行细菌扩增,酶切鉴定的阳性克隆测序。

2.3 电转化重组 pSK950 质粒到喹诺酮类药物敏感 *S. aureus* 的表达检测显示,敏感株金黄色葡萄球菌转 MgrA 经特异性引物 PCR 扩增后,扩增产物经 0.5% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示片段长度约 500 bp,表明经电转 MgrA 金黄色葡萄球菌敏感株 MgrA 表达明显增强。

3 讨 论

研究显示,医院感染的 *S. aureus*,特别是耐甲氧西林 *S. aureus*(MRSA)对抗生素有很高的耐药性,20 世纪 80 年代出现的氟喹诺酮类药物在治疗 MRSA 导致的感染上曾一度被寄予很高期望,目前其耐药率达 56.3%。因此,加强细菌对抗生素敏感性的监测,阐明细菌的耐药机制,对研制新的、有效的抗生素及耐药抑制剂显得尤为重要。

本研究采用生物工程技术,构建 *mgrA* 温敏穿梭载体,为进一步研究 *mgrA* 的耐药性及致病性提供方便、廉价、特异性的研究工具。将该重组载体电转化到 *S. aureus* 标准株和临床株中,为研究 *MgrA* 蛋白在 *S. aureus* 中高表达时,对喹诺酮类药物的敏感性、凝固酶活性及其基因序列影响,同时也为阐明 *S. aureus mgrA* 基因耐喹诺酮类药物的可能作用机制、研制新的、有效的抗生素及耐药抑制剂提供新的靶位等奠定实验基础。

参考文献

[1] Poole K. Efflux mediated resistance to fluoroquinolones

in Gram-negative bacteria[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2000,44:2233.

[2] Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, et al. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2000,44(12):3441.

[3] eski TA, Tomasz A. Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*:evidence for the cooperative functioning of PBP2,PBP4,and PBP2A[J]. *J Bacteriol*,2005,187(5):1815-1824.

[4] 连建奇,崔龙洙,平松启一.金黄色葡萄球菌调节基因 *mgrA* 高表达对苯唑西林耐药性的影响[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*,2006,26(7):603-609.

(收稿日期:2010-08-25)