

## · 论 著 ·

# 嗜麦芽窄食单胞菌产氨基糖苷类修饰酶基因 APH(3'')-I 和 AAC(2')-I 的克隆与表达

关小珊, 关锐梨, 钟华敏, 邓秋连, 谢永强, 周珍文<sup>△</sup>

(广州市妇女儿童医疗中心儿童院区检验科 510120)

**摘要:**目的 对嗜麦芽窄食单胞菌临床分离株 gzch810(SM gzch810)携带的产氨基糖苷类修饰酶基因 APH(3'')-I 和 AAC(2')-I 进行扩增、测序及原核表达,为下一步功能试验的开展提供基础材料。方法 提取 SM gzch810 基因组染色体,PCR 扩增 APH(3'')-I 和 AAC(2')-I 全基因并克隆入 pMD18-T 载体进行核苷酸序列分析;将 APH(3'')-I 和 AAC(2')-I 基因克隆至表达载体 pGEX-4T-1,转化大肠杆菌 BL21,SDS-PAGE 分析融合蛋白表达情况。结果 以染色体 DNA 为模板,成功扩增 800 bp APH(3'')-I 基因和 550 bp AAC(2')-I 基因;序列比对分析显示其与相关报道序列核苷酸和氨基酸一致性分别达 91% 及 95%;SM gzch810 APH(3'')-I 和 AAC(2')-I 序列已登录 GenBank(登录号:HQ315852 和 HQ315853);SDS-PAGE 显示,融合基因表达的蛋白相对分子质量分别约为  $56 \times 10^3$  和  $46 \times 10^3$ 。结论 从 SM gzch810 中成功克隆及表达了 APH(3'')-I 和 AAC(2')-I 基因,为下一步检测上述两种重组体大肠杆菌对相应抗菌药物的耐药性及其功能评价做好准备。

**关键词:**嗜麦芽窄食单胞菌; 产氨基糖苷类修饰酶基因; 克隆; 原核表达**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.15.018**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2016)15-2099-03

## Clone and expression of APH(3'')-I and AAC(2')-I gene of *Stenotrophomonas maltophilia*

GUAN Xiaoshan, GUAN Ruili, ZHONG Huamin, DENG Qiulian, XIE Yongqiang, ZHOU Zhenwen<sup>△</sup>

(Guangzhou Municipal Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

**Abstract: Objective** To perform the amplification, sequencing and prokaryotic expression of APH(3'')-I and AAC(2')-I genes from the clinically isolated gzch810 strain(SM gzch810)of *Stenotrophomonas maltophilia* to provide the basic materials for the next step functional test. **Methods** The SM gzch810 genome chromosome was extracted, the APH(3'')-I, AAC(2')-I whole genes were amplified by PCR and sequenced after being cloned into pMD18-T vector. The recombination were subcloned into pGEX-4T-1 vector and the expression of the recombinant APH(3'')-I and AAC(2')-I were analyzed by SDS-PAGE. **Results** The 800bp and 550bp DNA fragments of APH(3'')-I, AAC(2')-I gene were amplified from SM gzch810 by PCR and sequenced; the sequence comparison analysis showed that DNA and amino acid sequence identities of APH(3'')-I and AAC(2')-I genes with other strains were 91% and 95% respectively. The sequence of APH(3'')-I and AAC(2')-I of SM gzch810 were submitted to GenBank(accession number: HQ315852 and HQ315853);two major protein bands corresponding to the expected recombinant GST-TP fusion proteins ( $56 \times 10^3$  and  $46 \times 10^3$  respectively) were identified by SDS-PAGE. **Conclusion** APH(3'')-I and AAC(2')-I gene of SM gzch810 are successfully cloned and expressed, which lays a good foundation for further detecting corresponding antibiotic resistance and functional evaluation of above two kinds of recombinant E. coli.

**Key words:** *Stenotrophomonas maltophilia*; AMEs; clone; prokaryotic expression

嗜麦芽窄食单胞菌(SM)为医院内获得性感染的重要病原菌之一,中国 CHINET 监测网 2013 年度耐药监测数据表明,该菌占所有革兰阴性菌的 3.96%,非发酵菌的 10.82%<sup>[1]</sup>;国外文献报道,SM 引起肺部感染的归因死亡率高达 20%~30%<sup>[2]</sup>。SM 耐药机制复杂,对大多数抗菌药物耐药,是临床抗感染治疗中的一道难题,其中对  $\beta$ -内酰胺类、喹诺酮类药物的耐药机制已有较多研究,但对氨基糖苷类药物的耐药研究则较少。本文从临床儿童先天性心脏病患者血液分离菌株 gzch810 中 PCR 扩增出 APH(3'')-I 和 AAC(2')-I 基因并将其在大肠杆菌中进行表达,为下一步检测上述两种重组体大肠杆菌对氨基糖苷类抗菌药物的耐药性及其功能评价做好准备。

**1 材料和方法****1.1 材料****1.1.1 SM gzch810 分离株来源** 于 2012 年 5 月分离自本院

CICU 心脏病患者血液,患儿男性,日龄 8 d。

**1.1.2 试剂与仪器** pGEX-4T-1 质粒载体购自法国马西亚公司;pMD18-T 质粒载体,Ex-Taq DNA 聚合酶,EcoR I、Xho I 限制性内切酶,T4 DNA 连接酶等购自 Takara 公司。IPTG,丙烯酰胺、Tris 碱、甘氨酸等购自鼎国公司。德国 Biometra 公司 PCR 仪,英国 Uvitac 公司 GAS7508-T20 紫外凝胶成像分析系统,德国 Sorvall 公司 Micro 17R 台式高速冷冻离心机。

**1.2 方法**

**1.2.1 染色体 DNA 的提取及扩增** 根据 GenBank 提供的 Smlt2336(YP001972129.1) 和 Smlt1669(YP001971501.1) 序列,设计特异性引物两对:APH(3'')-I P1:5'-CGC GAA TTC ATG AGC GAA CCC TAC CTG AG-3',APH(3'')-I P2:5'-AAA CTC GAG TCA CTT CTC CGC CAG CGC CT-3';AAC

(2')-I P1; 5'-CGC GAA TTC ATG GGC CTG GAC ACA CAT TCA-3', AAC(2')-I P2; 5'-AAA CTC GAG TCA GAC CGT TTC GCC CTG CA-3', 引物序列分别加入 EcoR I、Xho I 酶切位点。以试剂盒提取的染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件为预变性 94 °C 5 min 后, 94 °C 45 s、60 °C 45 s、72 °C 1.5 min, 循环 35 次, 最后 72 °C 延伸 15 min。

**1.2.2 pMD18-T-APH(3')-I / AAC(2')-I 的构建及序列分析** PCR 产物纯化后与 pMD18-T 载体 16 °C 连接 2 h, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。挑取经氨苄西林筛选的阳性菌落提取质粒并经 EcoR I 和 Xho I 双酶切鉴定; 将鉴定含目的基因的质粒菌送 Invitrogen 公司进行测序并将测序结果进行 BLAST 比对分析。

**1.2.3 pGEX-4T-1-APH(3')-I / AAC(2')-I 的构建及表达** 纯化 PCR 产物与 pGEX-4T-1 载体经 EcoR I 和 Xho I 酶切后连接过夜, 转化大肠杆菌 BL21; 挑取经氨苄筛选的阳性菌落提取质粒并进行双酶切鉴定。将含有重组质粒的 BL21 接种于含氨苄西林(100  $\mu$ g/mL)的 LB 培养基, 37 °C 培养过夜后挑单菌落于含氨苄西林 LB 液体培养基中振荡培养至 OD600 值为 0.4 左右, 加 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 30 °C 诱导表达 5 h, 8 000 r/min 4 °C 离心 15 min, 收集菌体, SDS-PAGE 电泳鉴定。

## 2 结 果

**2.1 pMD18-T-APH(3')-I / AAC(2')-I 重组质粒的测序结果** 测序结果显示, SM gzch810 APH(3')-I 基因全长 813 bp; 预测的相对分子质量为 30 113.43, 等电点为 5.85。其序列已登录 GenBank, 登录号为 HQ315852, 与 SM K279a 株氨基酸同源性达 91%(图 1)。SM gzch810 AAC(2')-I 基因全长 549 bp; 预测的相对分子质量为 20 018.302, 等电点为 5.96。其序列已登录 GenBank, 登录号为 HQ315853, 与 SM K279a 株氨基酸同源性达 95%(图 2)。

**GENE ID: 6395755 Smt1669 | putative aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase [Stenotrophomonas maltophilia K279a] (10 or fewer PubMed links)**  
Score = 353 bits (90%), Expect = 4e-96  
Identities = 173/182 (95%), Positives = 176/182 (98%), Gaps = 0/182 (0%)  
Frame = +1  
Query 1 MGLDTHSFDEDRA[QVCRNQSVAPEHRQQAVDILRLQQAPPDMQGEGYAIPGPVALVLAM 180  
MGLDTHSFDEDRA[QVCRNQSVAPEHRQQAVDILRLQQAPPDMQGEGYAIPGPVALVLAM  
Sbjct 1 MGLDTHSFDEDRA[QVCRNQSVAPEHRQQAVDILRLQQAPPDMQGEGYAIPGPVALVLAM 80

Query 181 GG[VWAHLALYERNVLLDGEPEERGLIGGVVVRADVRQRGVASRLTEAAHAEELRRHGDID 360  
GG[VWAHLALYERNVLLDGEPEERGLIGGVVVRADVRQRGVASRLTEAAHAEELRRHGDID  
Sbjct 61 GG[VWAHLALYERNVLLDGEPEERGLIGGVVVRADVRQRGVASRLTEAAHAEELRRHGDID 120

Query 361 FAVLFALDHRYHAS[GIVPMQMNETCFIEDGH[RPFVYRGGMVA[LGARRW[TADLQLQE 540  
FAVLFALDHRYHAS[GIVPMQMNETCFIEDGH[RPFVYRGGMVA[LGARRW[TADLQLQE  
Sbjct 121 FAVLFALDHRYHAS[GIVPMQMNETCFIEDGH[RPFVYRGGMVA[LGARRW[TADLQLQE 180

Query 541 TV 546  
TV  
Sbjct 181 TV 182

**GENE ID: 6391401 Smt2336 | putative streptomycin resistance protein, streptomycin 3'-phosphotransferase [Stenotrophomonas maltophilia K279a]**  
Score = 475 bits (1223), Expect = 2e-132  
Identities = 246/270 (91%), Positives = 254/270 (94%), Gaps = 0/270 (0%)  
Frame = +1  
Query 1 MSEPYLSRWRLRDGPA[DEIHMARLWPVLTAA[GFMKLISSETEEQNNSHRLRWW[GDG 180  
MSEPYLSRWRLRDGPA[DEIHMARLWPVLTAA[GFMKLISSETEEQNNSHRLRWW[GDG  
Sbjct 1 MSEPYLSRWRLRDGPA[DEIHMARLWPVLTAA[GFMKLISSETEEQNNSHRLRWW[GDG 60

Query 181 AARLLAH[GPAFLIERA[GDSLQRQSIEGDD[ACTIILCQVLRQLRHPRSAPPAAELVCL 360  
AARLLAH[GPAFLIERA[GDSLQRQSIEGDD[ACTIILCQVLRQLRHPRSAPPAAELVCL  
Sbjct 61 AARLLAH[GPAFLIERA[GDSLQRQSIEGDD[ACTIILCQVLRQLRHPRSAPPAAELVCL 120

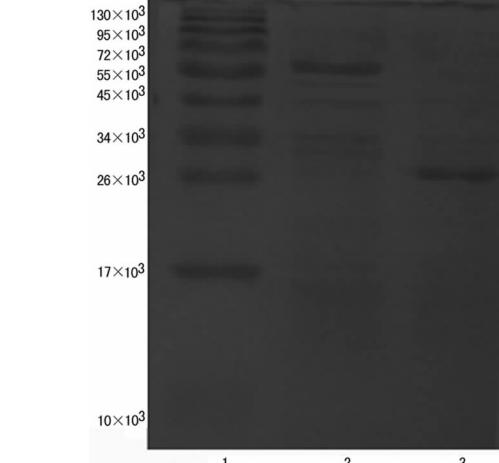
Query 361 [WFADLQQPRA[LPPILBQCRSLAEGL[DEB[EER[PPLHGDLHHDNVLDFG[RGWLAIDPK 540  
[WFADLQQPRA[LPPILBQCRSLAEGL[DEB[EER[PPLHGDLHHDNVLDFG[RGWLAIDPK  
Sbjct 121 [WFADLQQPRA[LPPILBQCRSLAEGL[DEB[EER[PPLHGDLHHDNVLDFG[RGWLAIDPK 180

Query 541 RLLGURAFDYTTMFNSPDLCPGP[G[WATRPERFA[RLDQV[SAL[LERTRLLRWIAS[A 720  
RLLGURAFDYTTMFNSPDLCPGP[G[WATRPERFA[RLDQV[SAL[LERTRLLRWIAS[A  
Sbjct 181 RLLGURAFDYTTMFNSPDLCPGP[G[WATRPERFA[RLDQV[SAL[LERTRLLRWIAS[A 240

Query 721 LSAVWFRDDGDFAD[DE[VARMALEALAEK 810  
LSAVWFRDDGDFAD[DE[VARMALEALAEK  
Sbjct 241 LSAVWFRDDGDFAD[DE[VARMALEALAEK 270

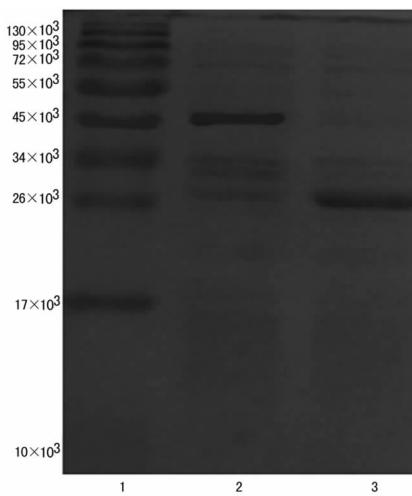
图 1 SM gzch810 APH(3')-I 与 SM K279a 株氨基酸同源性比较

**2.2 SDS-PAGE 检测 Smqnr 蛋白的表达** 重组菌经 IPTG 诱导后可见 GST 和 APH(3')-I、AAC(2')-I 的融合蛋白表达带, 相对分子质量分别约为  $56 \times 10^3$  和  $46 \times 10^3$ , 含空质粒菌经诱导后则在  $26 \times 10^3$  位置上出现 GST 表达带(图 3、4)。



注: Lane1 为预染蛋白 marker; lane2 为 pGEX-4T-1-APH(3')-I / BL21 经诱导; Lane3 为 pGEX-4T-1/BL21 经诱导。

图 3 重组蛋白表达产物 SDS-PAGE 电泳结果



注: Lane1 为预染蛋白 marker; lane2 为 pGEX-4T-1-AAC(2')-I / BL21 经诱导; Lane3 为 pGEX-4T-1/BL21 经诱导。

图 4 重组蛋白表达产物 SDS-PAGE 电泳结果

## 3 讨 论

SM 是医院内感染的重要致病菌之一, 对氨基糖苷类药物的耐药机制主要有:(1)膜屏障的改变或主动外排作用使药物的吸收减少;(2)核糖体结合位点的改变;(3)氨基糖苷类修饰酶(AMEs)对药物的修饰钝化作用, 其中以 AMEs 的作用为主。

要原因。常见的 AMEs 按功能可分为磷酸转移酶(APH)、乙酰转移酶(AAC)和核苷转移酶(ANT)3类,已在美国 NCBI 登录的 AMEs 基因有 30 余种<sup>[3]</sup>,目前在临床分离革兰阴性杆菌中,最常见的有 AAC(3)-I、AAC(3)-II、AAC(6')-I b、AAC(6')-II、ANT(2')-I、ANT(3')-I<sup>[4-5]</sup>共 6 种,但在 SM 中除 AAC(6')-I<sup>[6]</sup>、APH(3')-II c<sup>[7]</sup>外,仅有少量检出 ANT(2')-I、AAC(6')-II 和 AAC(3)-I / II<sup>[8-9]</sup>的报道。此类酶作用于氨基糖苷类抗菌药物特定的氨基或羟基,使抗菌药物发生钝化,降低或丧失对靶位核糖体的亲和力而不能进入下一阶段发挥抗菌作用。由 AMEs 所致的耐药性在不同的微生物或不同菌株之间有很大差异,取决于酶产生的数量、酶的催化活性和作用于何种抗菌药物等因素;在众多能产生足够活性而使细菌达到耐药标准的 AMEs 中,APHs 能造成高水平耐药<sup>[10]</sup>。

APH 是一种利用 ATP 作为第二底物,且能磷酸化所有氨基糖苷类抗菌药物的羟基酶。目前,临幊上分离到的 APH 有 7 种,其中 APH(3')-I 的作用底物只有链霉素,修饰其 3' 位羟基。本次实验检出的 APH(3')-I 基因经核苷酸及氨基酸序列分析,与 GenBank 上登记注册的 Smtl 2336、Smtl 1923 氨基酸同源性分别达到 91% 和 89%,是国内首次从临幊分离 SM 中检出 APH(3')-I 基因,该基因序列已登录 GenBank,登录号为 HQ315852。SDS-PAGE 结果显示,在 IPTG 的诱导下,重组表达质粒表达出了相对分子质量约  $56 \times 10^3$  的融合蛋白,与核苷酸序列推导的蛋白质分子量大小相符。

AAC 有 4 种同工酶: AAC(1)、AAC(3)、AAC(2') 和 AAC(6'),主要以乙酰辅酶 A 作为乙酰基的供体,分别作用于氨基糖苷类抗菌药物的 2'-脱氧链霉胺环的 1 位和 3 位、6'-氨基己糖环的 2' 位和 6' 位。AAC(6') 和 AAC(3) 多数由转座子、整合子和质粒等可移动遗传元件介导,在抗菌药物的选择压力下能在微生物间迅速播散<sup>[11-12]</sup>,而目前所发现的 AAC(2') 则均由染色体编码。本次实验检出的 AAC(2')-I 基因经测序及同源性分析,与 GenBank 上登记注册的 Smtl 1669 氨基酸同源性达 95%,与从结核分枝杆菌中检出的 AAC(2')-I c 同源性仅 30%,推测其具属特异性,不同菌属间不能传播。

本实验从临幊分离株 gzch810 中经 PCR 检出两种 AMEs 基因 APH(3')-I 和 AAC(2')-I,并对其进行克隆及表达,为下一步检测上述两种重组体大肠杆菌对相应抗菌药物的耐药性及其功能评价做好准备。

## 参考文献

- [1] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(5):365-374.
- [2] Falagas ME, Kastoris AC, Vouloumanou EK, et al. Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* infections:a systematic review of the literature[J]. Future Microbiol, 2009, 4(9):1103-1109.
- [3] Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes[J]. Drug Resist Updat, 2010, 13(6):151-171.
- [4] Ho PL, Leung LM, Chow KH, et al. Prevalence of aminoglycoside modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methylase genes among aminoglycoside-resistant *Escherichia coli* isolates[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2014, 14:1-4.
- [5] Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, et al. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 78(1):66-69.
- [6] Li XZ, Zhang L, Mckay GA, et al. Role of the acetyltransferase AAC(6')-Iz modifying enzyme in aminoglycoside resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(4):803-811.
- [7] Okazaki A, Avison MB. Aph(3')-II c, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(1):359-360.
- [8] 时东彦,付洁,李扬. 嗜麦芽窄食单胞菌中氨基糖苷修饰酶基因的研究[J]. 医药导报,2009,28(4):427-429.
- [9] 刘治敏,潘亚萍,吴桂华,等. 189 株嗜麦芽寡养单胞菌耐药性检测与氨基糖苷类修饰基因的分布[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(2):231-233.
- [10] Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(3):430-450.
- [11] Diaz MA, Cooper RK, Cloeckaert A, et al. Plasmid-mediated high-level gentamicin resistance among enteric bacteria isolated from pet turtles in Louisiana[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(1):306-312.
- [12] 邓笑伟,张丹梅,刘长庭,等. 嗜麦芽寡养单胞菌修饰酶与 I 类整合子酶基因的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(17):2233-2235.

(收稿日期:2016-01-18 修回日期:2016-05-05)

(上接第 2098 页)

- (4):450-453.
- [12] Bauserman MS, Laughon MM, Hornik CP, et al. Group B streptococcus and escherichia coli infections in the intensive care nursery in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis[J]. Pediatr Infect Dis J, 2013, 32(3):208-212.
- [13] 王清清,苏卫东. 新生儿 B 族链球菌败血症 15 例临床分析[J]. 浙江中西医结合杂志,2015,25(2):194-196.
- [14] Verani JR, McGee L, Schrag SJ, et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines

from CDC, 2010[J]. MMWR Recomm Rep, 2010, 59(RR-10):1-36.

- [15] 李丽,吴伟元,吴本清,等. 新生儿 B 族溶血链球菌感染血清型与临床表现相关性及药敏分析[J]. 中国新生儿科杂志,2015,30(5):339-342.
- [16] 邵陆军,陈国强. 儿童医院感染洋葱伯克霍尔德菌三年临床分布特征调查[J]. 中国微生态学杂志,2013,25(11):1310-1312.

(收稿日期:2016-01-19 修回日期:2016-05-04)