



论文

铜绿假单胞菌耐药性相关基因的筛选及鉴定

陈林^{①†}, 杨亮^{①†}, 赵兴艳^①, 沈立新^①, 段康民^{①②*}

① 西北大学生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 西安 710069;

② Department of Biochemistry and molecular biology, Faculty of medicine, University of Calgary, Alberta T2N 4N1, Canada

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: kduan@nwu.edu.cn

收稿日期: 2010-06-11; 接受日期: 2010-07-28

国家自然科学基金(批准号: 30870097)资助项目

摘要 铜绿假单胞菌在人体内能引起严重的感染. 由于铜绿假单胞菌高水平的内在性和获得性耐药性, 使其引起的感染难以治愈. 为解决该问题, 弄清病原菌抗生素抗性的分子机制是一个关键. 本实验构建了含有 17000 个铜绿假单胞菌转座突变株文库, 并在 LB 固体平板上, 用 7 种抗生素在最小抑制浓度(MIC)和 1/2MIC 条件下, 筛选抗生素抗性发生变化的突变株. 结果确定了 43 株转座突变株, 每个突变株对至少一种抗生素的敏感性表现出增加 3 倍或降低 1/2 的表型. 通过随机 PCR 和 DNA 测序, 确定了这些铜绿假单胞菌突变体中转座子在基因组上的插入位点, 确定了被破坏的基因. 其中, 9 个是已知的与抗生素抗性相关基因, 包括 *mexI*, *mexB* 和 *mexR*; 24 个是以前未知与抗性相关的基因, 包括一个菌毛合成基因 *pilY1*, 这个菌毛合成基因的破坏导致菌株对羧苄青霉素的 MIC 增加了 128 倍. 此外, 43 个基因中有 12 个是功能完全未知的基因. 这些基因的筛选鉴定有助于了解铜绿假单胞菌中抗生素抗性的产生机制, 这些基因或许可成为控制或扭转抗生素抗性的作用靶点.

关键词铜绿假单胞菌
转座突变
耐药性
基因组

铜绿假单胞菌是一类机会致病菌. 它能在人体引起严重的急性和慢性感染, 同时也是医院感染的重要致病菌之一. 由于铜绿假单胞菌对多种抗菌制剂存在较高的内在性抗性, 使其导致的感染很难被治愈. 铜绿假单胞菌产生的获得型抗性以及由于基因突变产生的抗性也使得抗菌药物的使用面临巨大挑战. 在治疗过程中, 病原菌产生即使是很小的抗性变化也会大大影响抗生素的治疗效果.

铜绿假单胞菌产生内在性耐药性的原因包括: 外膜低通透性、依靠能量的药物外排机制及产生使抗生素失活的酶类等. 同时, 细菌中大量非生存必需的蛋白也可能对其内在耐药性发挥重要作用^[1].

为了更好地了解铜绿假单胞菌抗生素抗性的产生过程和分子机制, 筛选了含有 17000 个突变体的铜绿假单胞菌转座突变体文库, 确定了 45 个铜绿假单胞菌与内在耐药性相关基因, 其中大部分是第一次

发现与抗生素抗性有关。

1 材料与方法

1.1 菌株、生长条件和抗菌制剂

用于构建转座突变体文库的铜绿假单胞菌 PAO1^[2]在 Luria-Bertani(LB)固体或液体中 37℃培养。含有质粒 pBT20^[3]的大肠杆菌 SM10-λpir 在含有 15 μg/mL 庆大霉素的 LB 培养基中生长。

磺胺(Sul)、羧苄青霉素(Car)、庆大霉素(Gen)、氯霉素(Chl)、环丙沙星(Cip)、多黏菌素(Pol)和四环素(Tet)购自 Amresco 公司(索伦, 美国); 假单胞菌分离琼脂(PIA)购自 Difco 公司(劳伦斯, 美国)。

1.2 转座突变体文库的构建

通过杂交的方法把供体菌, 大肠杆菌 SM10-λpir 中 pBT20^[3]上的转座子插入到铜绿假单胞菌(PAO1)染色体上。转座突变体用含有 Gen(150 μg/mL)的 PIA 固体平板筛选。37℃过夜培养, 挑出庆大霉素抗性单克隆, 接种到 384 孔板上, 过夜培养后用 10% DMSO 于-70℃保存。

1.3 最小抑制浓度(MIC)的确定

用 1/2 浓度梯度稀释方法在 96 孔板中测定最小抑制浓度^[4]。对照组中不含抗生素。实验组每个孔里接上适量菌液(先在 LB 培养基中活化), 使其起始菌液浓度在 595 nm 吸光值为 0.06~0.07。每种抗生素的 MIC 是指抑制菌体生长的最小抗生素浓度。在固体培养基上, MIC 亦指抑制菌体生长的最小抗生素浓度。

1.4 转座突变体文库中抗生素敏感突变体和抗性突变体的筛选

第一次筛选是在 LB 固体平板上进行。平板中分别含有 MIC 或 1/2 MIC 的羧苄青霉素、环丙沙星、氯霉素、红霉素、多黏菌素、磺胺和四环素。菌体在每孔含有 70 μL LB 的 384 孔板上 37℃培养 16 h, 随后用 Multi-blot replicator(48 针)把菌液点在含有抗生素的 LB 固体平板上, 培养 16~24 h。为了便于比较, 每个平板上有一个野生型 PAO1 菌株作为对照。实验重复 3 次。挑出抗性有变化的突变体接到 96 孔板上, 用 10% DMSO 于-70℃保存。

为了进一步验证筛选结果, 将第一次筛选得到的突变体在 96 孔板中用液体培养基进行测试。突变体接种于 96 孔板中的 100 μL LB 培养基中 37℃过夜培养。5 μL 种子液转接到新鲜培养基中 200 r/min 活化 3 h。随后将菌液接种到含有不同抗生素浓度(1/4, 1/8, 1/3 MIC 或 2×, 4×, 8×, 16×MIC)的 LB 培养基中, 终浓度达到吸收光 595 nm 为 0.06~0.07, 37℃培养 24 h。用 Victor³ 多标记微孔板检测仪(multilabel plate reader)检测细菌生长状况(A_{595}), 最后确定每个突变体对不同抗生素的 MIC。

1.5 突变体中转座子插入位点的确定

使用随机 PCR 方法, 确定转座子在 PAO 染色体上的插入位点^[5,6]。PCR 产物测序后, 与铜绿假单胞菌染色体序列^[7]进行比对, 对转座子的插入位点进行定位。

2 结果

2.1 抗生素敏感突变体和抗性突变体的筛选

为了筛选对抗生素的抗性有影响的细菌基因, 利用携带转座子的 pBT20(Tn5 的衍生物)^[3]构建了含有 17000 个单克隆的铜绿假单胞菌转座突变体文库。选择不同类型的 7 种抗生素: 羧苄青霉素、四环素、氯霉素、环丙沙星、红霉素、磺胺和多黏菌素, 对突变体文库进行筛选, 筛选对抗生素抗性有影响的基因(图 1)。以野生型作为对照, 在突变体库中筛选得到 56 株对一种或者多种抗生素敏感性提高 3 倍或降低 1/2 的抗性突变体。其中两株对四环素的抗性提高

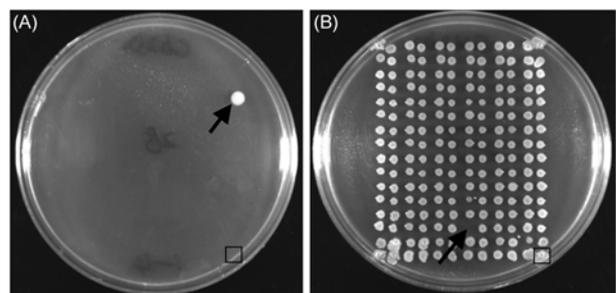


图 1 平板筛选抗生素敏感性和抗性变化的转座突变体 (A) 抗性突变体能够在含有 MIC 浓度抗生素的固体平板上生长(箭头所示); (B) 敏感性突变体不能在含有 1/2 MIC 浓度抗生素的固体平板上生长(箭头所示)。对照 PAO1 为方框所示

了 128 倍. 在筛选过程中, 突变体对磺胺和多黏菌素的 MIC 未发生改变.

2.2 突变体中转座子插入位点的确定

为了确定转座子插入染色体的具体位置, 对筛选得到的突变体随机 PCR 测序, 将测序结果与铜

绿假单胞菌的基因组数据库(<http://www.pseudomonas.com/>)比对. 最终确定了 42 个基因和 1 个基因间隔区与抗生素敏感性相关(表 1). 其中有多个克隆的突变位点发生在同一基因上. 在这 42 个突变体中, 转座子都插入在单独的可读框中, 仅在一个突变体中, 转座子插入在基因间隔区, 位于 PA0716 和 PA0717 之间.

表 1 抗性突变体转座子插入位点及敏感性变化^{a)}

基因序号	蛋白名称或功能*	抗生素敏感性改变倍数#				
		羧苄青霉素	氯霉素	环丙沙星	红霉素	四环素
PA0496***	conserved hypothetical protein(Class 4)	+64				
PA0646*	hypothetical protein (Class 4)	+16				
PA0714*	hypothetical protein (Class 4)	+16				
PA1035*	hypothetical protein (Class 4)	-3				
PA2580**	conserved hypothetical protein (Class 4)	-3	-2	-2		
PA2699*	hypothetical protein (Class 4)	+16				
PA2800*****	conserved hypothetical protein (Class 4)			-2		-3
PA3054*	hypothetical protein (Class 4)		+16			+4
PA3649*	conserved hypothetical protein (Class 4)	-3				
PA4452*	conserved hypothetical protein (Class 4)			-2		-4
PA4692*	conserved hypothetical protein (Class 4)		+8			+4
PA5488*	hypothetical protein (Class 4)		+16			
PA0011***	probable 2-OH-lauroyltransferase (Class 3)	-6				
PA1027*	probable aldehyde dehydrogenase (Class 3)		+8			
PA2010*	probable transcriptional regulator (Class 3)					-3
PA2020*	probable transcriptional regulator (Class 3)		+8			
PA2940*	probable acyl-CoA thiolase (Class 3)	+32				
PA3647*	probable outer membrane protein precursor (Class 3)	-3		-3		
PA3918*	molybdopterin biosynthetic protein C (Class 3)		+8			
PA4342*	probable amidase (Class 3)		+8	+8		+4
PA4456***	probable ATP-binding component of ABC transporter (Class 3)		-3	-3		-4
PA4960*	probable phosphoserine phosphatase (Class 3)	-3				
PA5174*	probable beta-ketoacyl synthase (Class 3)	-9	-2			
PA5238*	probable O-antigen acetylase (Class 3)	-3	-2			
PA5301*	probable transcriptional regulator (Class 3)		+8			+2
PA3528*	<i>rnt</i> , ribonuclease T (Class 2)					
PA3620**	<i>mutS</i> , DNA mismatch repair protein MutS(Class 2)			+64		+4
PA4024*	<i>eutB</i> , ethanolamine ammonia-lyase large subunit (Class 2)		+16	+16		+4
PA4047*	<i>ribA</i> , GTP cyclohydrolase II (Class 2)	-3				
PA4743*	<i>rbfA</i> , ribosome-binding factor A (Class 2)	-6				
PA4812*	<i>fdnG</i> , formate dehydrogenase-O, major subunit (Class 2)		+8			+4
PA5372*	choline dehydrogenase (Class 2)		+8			+2
PA0424*	<i>mexR</i> , multidrug resistance operon repressor MexR (Class 1)		+8			+4
PA0426*	<i>mexB</i> , RND multidrug efflux transporter MexB (Class 1)	-6	-2			
PA1903*	<i>phzE2</i> , phenazine biosynthesis protein PhzE (Class 1)	+16				
PA4207*	probable RND efflux transporter (Class 1)		+8	+8		+4
PA4214*	<i>phzE1</i> , phenazine biosynthesis protein PhzE (Class 1)	+16				
PA4554*	<i>pilY1</i> , type 4 fimbrial biogenesis protein PilY1 (Class 1)	+128				
PA4556*	<i>pilE</i> , type 4 fimbrial biogenesis protein PilE (Class 1)	+16				
PA5015*	<i>aceE</i> , pyruvate dehydrogenase (Class 1)	-3				
PA5426*	<i>purE</i> , phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit (Class 1)					-4
PA0716-PA0717*	Intergenic region	+128				

a) *: 相同插入转座突变体个数; #: 敏感性变化倍数; +: 抗性提高; -: 抗性降低; Car: 羧苄青霉素; Chl: 氯霉素; Cip: 环丙沙星; Tet: 四环素; Ery: 红霉素

在很少的一些突变体中, 转座子插入到已知的抗性基因中, 如 PA0424(*mexR*), PA0426(*mexB*)和 PA4207(*mexI*). 但是, 大部分突变体中, 转座子破坏的基因是先前未报道过与抗生素抗性相关的基因. 如筛选得到的基因 *pilYI*, 它的失活能导致野生型 PA14 和 PAO1 蹭行运动能力的丢失; 并在鼠科呼吸系统感染模型实验中, 该基因的失活, 不仅促进了细菌稳定期的生长, 而且提高了细菌的存活率^[8]. 筛选得到的 PA3647 可能属于膜蛋白家族, PA4456 可能是 ABC 运输泵的组成成份, PA3620 编码 DNA 错配修复蛋白, PA4960 编码的产物可能是磷酸丝氨酸磷酸酶. 筛选结果中也包括 3 个已经被证明的调节子, 另外 12 个是已知的编码不同酶的基因.

值得注意的是, 筛选结果中的 14 个基因归类于假设或保守假设的蛋白(4 类), 目前还未见任何关于它们功能的报道. 这类功能未知基因在筛选得到的 42 个基因中占 1/3.

2.3 与其他研究结果的比较

Fajardo 等人^[9]筛选了 2 个不同标记的铜绿假单胞菌转座子突变体库, 确定了铜绿假单胞菌基因组上 112 个位点对抗生素敏感性表型特征有影响. 另外, 据 Dotsch 等人^[10]报道, 有 205 个基因与其内在抗性有关. 而本实验得到的结果与上述结果相比, 筛选得到的基因没有太多重复(图 2). 在本研究中, 只有 6 个基因与 Dotsch 等人^[10]的结果相同, 与 Fajardo 等人^[9]报道结果没有任何重复. 而这两个早前研究结果中相重复的也只有 6 个基因.

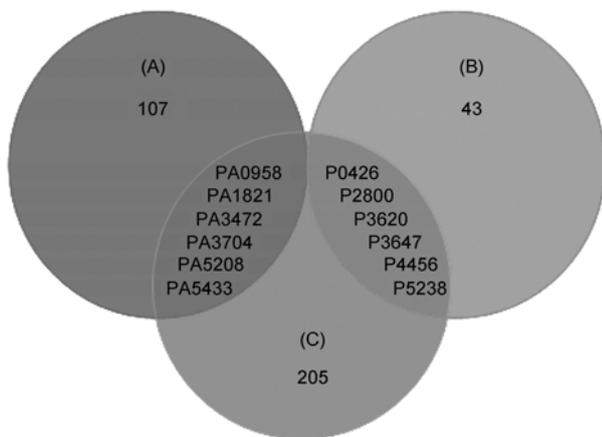


图 2 维恩图解展示 3 种不同筛选结果

(A) Fajardo 等人研究结果; (B) 本研究结果; (C) Dotsch 等人研究结果

3 讨论

病原菌对抗生素的耐药性能使临床用抗生素失效, 这成为人类医学面临的一个很严重的问题. 研究抗生素耐药性的分子机制是解决该问题的一个关键途径. 本工作旨在找到病原菌产生内在抗生素耐药性的相关基因及其作用机制. 使用琼脂平板筛选转座子突变体库的方法, 鉴定了 43 个影响铜绿假单胞菌抗生素敏感性的基因.

在这些基因中, *mexB* 和 *mexR* 分别编码一个多重耐药结节细胞分化(RND)外排泵和一个转录抑制子. 这些泵和抑制子的破坏可导致多重耐药^[11,12]. 突变体(转座子插入到 PA4456)对 3 种抗生素更加敏感. 基因 PA4456 编码一个假定的 ATP 依赖 ABC 转运蛋白的结合组分. 本研究结果(未发表资料)显示, 在铜绿假单胞菌中基因 PA4456 与其相邻基因参与编码的 ABC 转运蛋白, 可能参与四环素的外排.

转座子插入在基因 PA0716 和 PA0717 之间, 导致羧苄青霉素的 MIC 增加了 128 倍. PA0716 编码一个未知功能的假设蛋白, 而 PA0717 可能编码一个和噬菌体 Pf1 相似的蛋白. 两个基因间隔 891 bp. 该区域有可能编码小 RNA 或短肽, 对羧苄青霉素的抗性起重要作用. 但也有可能是转座子上的启动子改变了邻近基因的表达, 从而导致抗性变化, 需要进一步研究来探明该区域是如何导致铜绿假单胞菌抗性变化的.

在筛选得到的这些基因中, 绝大多数基因先前并没有被报道与抗生素抗性相关. 本研究证明这些基因与铜绿假单胞菌内在抗性相关. 推测, 细菌对抗生素的内在抗性和获得性抗性可能是许多蛋白复杂相互作用的结果. 这些蛋白中的一部分可能在正常条件下, 对细菌正常代谢发挥作用, 而非只针对抗生素起作用.

值得注意的是, 在其他两个相似的研究中, 本文报道的这些基因中的大部分并没有被确定. 筛选结果的差异可能由不同的方法, 如选用的抗生素不同所导致. 结果提示, 在铜绿假单胞菌中, 可能仍然存在与抗生素抗性相关的基因没有被确定. 有待于进一步深入地研究来鉴定与抗生素抗药性相关的基因及相应的分子作用机制. 本研究结果有助于理解病原菌抗生素的耐药性, 这些已鉴定的基因有可能成为控制其耐药性的分子靶点.

参考文献

- 1 Gomez M J, Neyfakh A A. Genes involved in intrinsic antibiotic resistance of *Acinetobacter baylyi*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50: 3562—3567
- 2 Holloway B W. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol*, 1955, 13: 572—581
- 3 Kulasekara H D, Ventre I, Kulasekara B R, et al. A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Mol Microbiol*, 2005, 55: 368—380
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 5 Jacobs M A, Alwood A, Thaipisuttikul I, et al. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 14339—14344
- 6 Liang H, Li L, Dong Z, et al. The YebC family protein PA0964 negatively regulates the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal system and pyocyanin production. *J Bacteriol*, 2008, 190: 6217—6227
- 7 Stover C K, Pham X Q, Erwin A L, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000, 406: 959—964
- 8 Bohn Y S, Brandes G, Rakhimova E, et al. Multiple roles of *Pseudomonas aeruginosa* TBCF10839 PilY1 in motility, transport and infection. *Mol Microbiol*, 2009, 71: 730—747
- 9 Fajardo A, Martinez-Martin N, Mercadillo M, et al. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One*, 2008, 3: e1619
- 10 Dotsch A, Becker T, Pommerenke C, et al. Genomewide identification of genetic determinants of antimicrobial drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 2522—2531
- 11 Saito K, Eda S, Maseda H, et al. Molecular mechanism of MexR-mediated regulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 195: 23—28
- 12 Adewoye L, Sutherland A, Srikumar R, et al. The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *J Bacteriol*, 2002, 184: 4308—4312