

氨基糖苷-(3)-乙酰转移酶 II 的表达纯化及初步活性

王震^{1,2} 陈云波^{1,2} 查长森^{1,2} 邹立林^{1,2} 彭颖^{1,2}季敬璋^{1,2} 陈秀枢³ 吕建新^{1,2*}(温州医学院, ¹浙江省医学遗传学重点实验室, ²细胞与分子医学研究所, ³微生物学研究所, 温州 325035)

摘要 用 PCR 扩增的氨基糖苷-(3)-乙酰转移酶 II [*aac(3)-II*] 基因构建了能表达较高活性 AAC(3)-II 的重组工程菌, 并获取重组 AAC(3)-II。含 pET28a 质粒的工程菌转入 *aac(3)-II* 基因前后对氨基糖苷类抗生素的最低抑菌浓度进行比较, 重组菌超声裂解上清液及其纯化的 AAC(3)-II 进行 SDS-PAGE 和 Western 印迹电泳鉴定。最低抑菌浓度表明转入 *aac(3)-II* 基因的工程菌比未转入的工程菌对庆大霉素(gentamicin, GEN)的提高了 256 倍, 对妥布霉素(tobramycin, TOB)及其奈替米星(netilmicin, NTL)提高了 16 倍, 电泳鉴定表明纯化获取的是重组 AAC(3)-II, 其相对分子质量约为 32 kDa, 纯度大于 95%, 纯化后的 10 μ g AAC(3)-II, 分别在 10 s 内使 80 μ g GEN、30 s 内使 80 μ g TOB 和 NTL 乙酰化而失去抑菌作用。研究为氨基糖苷类抗生素伴侣的开发研究初步打下基础。

关键词 氨基糖苷乙酰转移酶; 最低抑菌浓度; 纯化; 氨基糖苷类抗生素

细菌产生氨基糖苷类修饰酶(aminoglycoside modifying enzymes, AMEs)是对氨基糖苷类抗生素(aminoglycosides, AGs)产生耐药的主要因素, 该类修饰酶催化 AGs 氨基或羟基的共价修饰, 使修饰后的 AGs 与核糖体 30S 亚基结合减少, 从而导致细菌产生耐药。在细菌胞浆内对抗生素进行修饰的钝化酶主要有三类: 氨基糖苷磷酸转移酶(aminoglycoside phosphotransferases, APH)、氨基糖苷乙酰转移酶(aminoglycoside acetyltransferases, AAC)和氨基糖苷类核苷转移酶(aminoglycoside nucleotidyltransferases, ANT)^[1]。

在乙酰辅酶 A 的存在下, AAC 使 AGs 中的 2-脱氧链霉胺的氨基发生乙酰化。目前已知 AAC 有四种: AAC(6')、AAC(2')、AAC(3)和 AAC(1)。其中 AAC(3)-II 是最常见的氨基糖苷修饰酶^[2], 可使庆大霉素、妥布霉素等 3 号位的氨基乙酰化, 从而使该抗生素失去药效。临床上以注射方式给 AGs 时, 不仅目标区域有 AGs 作用, 而且其他器官、组织也有其残留。静脉注射后, 一部分药物经过血循环扩散到肠液、胆汁、唾液、阴道分泌物等体液, 带抗生素体液再进入无需治疗的肠道、口腔、阴道等微生态平衡的环境, 杀灭有益菌, 而耐药菌却能繁殖, 最终导致发生菌群失调的伴联性疾病(如伪膜性肠炎、阴道炎等)。

针对这一现象, 通常的解决方式是在抗生素治疗的同时, 服用肠道益生菌制剂, 或促进有益菌生长的

药剂^[3], 但这种治疗方式的最大的缺点是滞后性, 即在肠道菌群被破坏后才有效。有鉴于此, 本课题从逆向思维方式着手, 旨在将严重影响 AGs 治疗效果的 AAC 开发成为一种 AGs 抗菌素伴侣。在用 AGs 注射治疗的同时, 服用以 AAC 为主要成份的缓释胶囊, 使分泌到微生态环境的 AGs 在杀灭无辜菌群前失去药效, 从而到达保护正常菌群的作用。

前期实验中, 我们筛选了对 AGs 耐药的天然大肠杆菌, 挑选出一株底物谱广、耐药性高的菌株, 克隆其耐药基因, 经过测序鉴定为 *aac(3)-II* 基因; 在本实验中, 对该基因进行表达, 鉴定表达的纯化产物为 AAC(3)-II, 对产酶工程菌进行初步的活性鉴定, 从而为进一步满足产业化的需求打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

aac(3)-II 基因来源的临床分离株 *E.coli* WZ30, pET28a 表达载体、*E.coli* BL21(DE3)、标准质控 *E.coli* ATCC25922 由浙江省医学遗传学重点实验室提供。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Nco*I、*Xho*I、pMD 18-T vector、

收稿日期: 2006-06-20 接受日期: 2006-10-19

浙江省科技厅重点项目(No.2004C23018)

* 通讯作者。Tel: 0577-86689805, Fax: 0577-86689776, E-mail:

ljx@wzmc.net

T4 连接酶、Tag DNA 聚合酶、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自宝生物工程有限公司; His-Tag 亲和树脂试剂盒, His-Tag 单克隆抗体购自美国 Novagen 公司; 二抗羊抗鼠 IgG- 辣根过氧化物酶, 蛋白质预染 Marker, ECL 化学发光试剂盒购自珠海百奥生物技术公司。庆大霉素(gentamicin, GEN)、阿米卡星(amikacin, AMK)、奈替米星(netilmicin, NTL)和妥布霉素(tobramycin, TOB) 购自华北制药有限公司; 依替米星(etimicin, ETM)购自杭州爱大制药有限公司; 卡那霉素(kanamycin, KAN)购自上海普飞生物技术有限公司; 大观霉素(spectinomycin, SPM)购自普强苏州制药有限公司; 乙酰辅酶 A 购自 Sigma 公司。

1.3 pET28-aac(3)-II 重组质粒的构建和鉴定

PCR 扩增临床分离株 *E. coli* 中的 *aac(3)-II* 基因克隆至 pMD 18-T 载体, pMD18T-*aac(3)-II* 和 pET28a 质粒用 *Nco*I、*Xho*I 双酶切, 经 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化 *aac(3)-II* 基因和 pET28a 质粒大片段, 用 T4 连接酶在 16 °C 连接过夜后, 转化到感受态 *E. coli* BL21(DE3), 再将转化菌涂布于含终浓度为 30 µg/ml KAN 的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜, 挑取单菌落扩大培养, 提取质粒, 酶切电泳鉴定。重组成功的克隆菌进行最低抑菌浓度(MIC)实验。

1.4 发酵

接种阳性的重组菌于 100 ml LB 培养基中, 37 °C、150 r/min 振荡培养过夜后, 作为种子菌按 2% 体积加入 1 L LB 培养基(终浓度 30 µg/ml KAN), 当菌体生长至 A_{600} 为 0.6 时, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 6 h 后发酵终止。

1.5 重组 AAC(3)-II 的亲纯化

发酵菌液 8 000 r/min, 4 °C、20 min 离心, 收集沉淀, 加 70 ml PBS 吹悬菌体后, 冰浴进行超声破碎。超声破碎液, 20 000 r/min, 4 °C, 离心 30 min, 上清液为制备的样品液。

取 10 ml Ni^{2+} -NTA 琼脂糖装柱, 用结合缓冲液平衡。获得的超声上清液经 0.45 µm 滤膜过滤后, 缓慢过柱, 用 100 ml 的结合缓冲液洗柱, 再用 60 ml 的洗涤缓冲液(0.5 mol/L NaCl, 60 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9)洗柱, 最后用 100 ml 洗脱缓冲液(1 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9)洗脱目的蛋白, 取洗脱液及其超声上清液加入等体积 2×SDS 上样缓冲液, 15% SDS 电泳。

1.6 Western 印迹鉴定重组蛋白质

重组的 AAC(3)-II 融合 6×His-Tag, 因而可用 His-Tag 单克隆抗体初步检测纯化蛋白质的免疫反应

性。SDS-PAGE 电泳完成后, 电转移蛋白质到硝酸纤维素膜, 进行 Western 印迹杂交。按 ECL 免疫荧光显色试剂盒中说明书操作, 最后将 X 线胶片在暗盒中曝光 10 min(室温), X 线胶片常规显影及定影。

1.7 重组工程菌 MIC 测定

本实验采用琼脂二倍稀释法测定 MIC^[4], 操作和结果判定均依照全国临床实验标准委员会(NCCLS) 2002 年规定进行。各抗生素的最终浓度系列均为 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0, 128.0, 256.0 µg/ml, 将细菌点种在平板上, 菌量约为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml, 置于 35 °C 培养箱温育 16~18 h 后判读结果。

1.8 重组酶降解 AGs 产物的抑菌实验

GEN、TOB 及其 NTL 溶于无菌蒸馏水中, 配成 40 µg/ml 的工作液。取 5 支试管分别加 2 ml 的 GEN、TOB 及其 NTL 工作液, 再加 10 µg 纯化的 AAC(3)-II 和 40 µg 乙酰辅酶 A, 在 37 °C 水浴中放置 0 s、10 s、20 s、30 s、40 s 后, 最后加入 1 ml 1 mol/L HCl 终止酶反应。取终止后的酶降解液 2 ml 加到 45 °C 水浴恒温的 18 ml LB 培养基、再加 10 µl A_{600} 为 0.6 的 *E. coli*(ATCC25922)、混匀, 倾倒入平皿, 对比不同平皿的菌落数。

2 结果

2.1 重组质粒的构建和鉴定

pET28-aac(3)-II 重组质粒的构建按图 1 方案进行, 此方案保证了重组的 *aac(3)-II* 基因在 pET 28a 质粒 T7 启动子的控制下, 形成 6×His 的融合蛋白。琼脂糖凝胶电泳见图 2, 经 *Nco*I 和 *Xho*I 双酶切后得到 863 bp 和 5 235 bp 两条片段(泳道 1), 经 *Xho*I 单酶切后得到 6 099 bp 的片段, 与预期相符, 纯化质粒送宝生物公司测序, 确证 *aac(3)-II* 型基因已成功克隆。

2.2 AAC(3)-II 的纯化及其电泳分析

取 pET28-aac(3)-II 超声上清液(图 3 泳道 1)进行亲和层析, 重组 AAC(3)-II 有 6×His 尾, 能够和金属 Ni^{2+} 亲和树脂结合, 而杂蛋白质不结合则被除去。最后用洗脱液把所有结合在树脂上的蛋白质进行洗脱, 得到目的蛋白(图 3 泳道 2), 超声裂解上清液及其纯化的蛋白质分别取 10 µl, 15% SDS 电泳。超声上清液及其纯化的蛋白质在 32 kDa 处有较为明显地蛋白质染色带, 经过亲和层析后, 超声上清液仅在 32 kDa 处有明显蛋白质染色条带, 和预计的重组 AAC(3)-II 分子量吻合, 初步判定为 AAC(3)-II。

从蛋白质纯化的 280 nm 波长紫外吸收峰图可以清晰的看到, 除在洗脱体积为 40~60 ml 时有一个吸

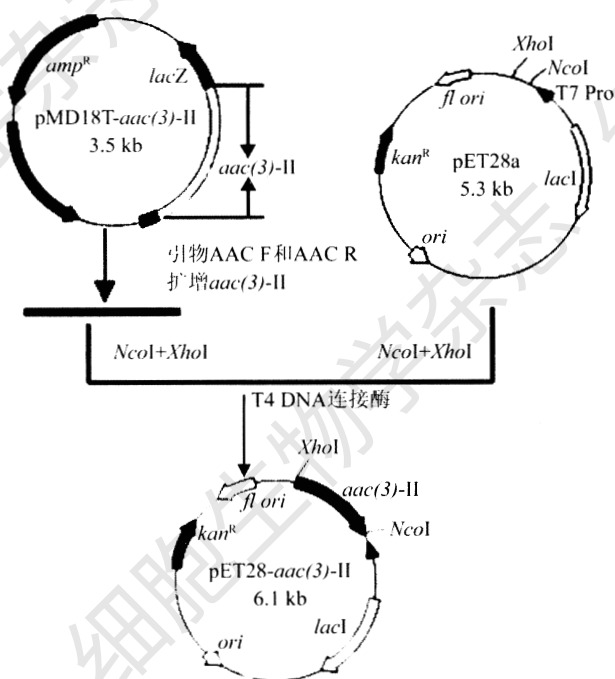


图1 表达载体 pET28-aac(3)-II 的构建图

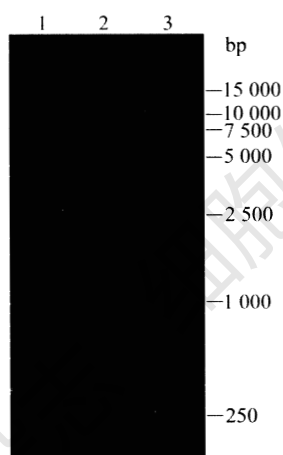


图2 重组质粒 pET28-aac(3)-II 酶切

1: *NcoI* 和 *XhoI* 双酶切 pET28-aac(3)-II; 2: *XhoI* 单酶切 pET28-aac(3)-II; 3: DL15000 marker。

收峰, 无其他明显吸收峰(图4), 经过计算, 吸收峰代表的蛋白质占总蛋白吸光度的 95% 以上。

2.3 Western 印迹鉴定

Western 印迹结果显示单一明显条带, 表明纯化的蛋白质含有 His 尾能与 His 抗体有良好的免疫反应性, 纯化蛋白质分子量约为在 32.0 kDa 与预期的重组 AAC(3)-II 分子量相符, 确证纯化的蛋白质为重组 AAC(3)-II(图5)。

2.4 抑菌实验

pET28a/BL21, BL21(DE3)及其 ATCC25922 等对

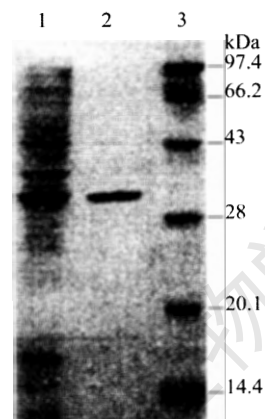


图3 pET28-aac(3)-II 纯化上清液的 SDS-PAGE 分析

1: 重组菌超声上清液(pET28-aac(3)-II/BL21); 2: 纯化的重组 AAC(3)-II; 3: marker。

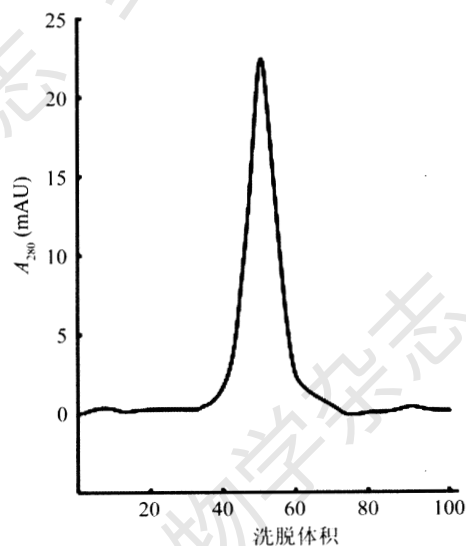


图4 镍亲和层析后的 AAC(3)-II 洗脱峰

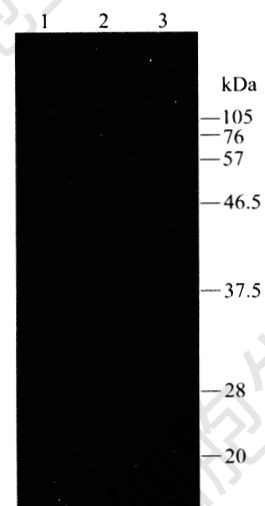


图5 Western 印迹检测 AAC(3)-II 的免疫反应性

1: 重组菌超声上清液[pET28-aac(3)-II/BL21]; 2: 纯化的重组 AAC(3)-II; 3: marker。

表1 工程菌和阴性对照菌对不同类型 AGs 时的 MIC (mg/ml)

<i>E.coli</i> strain	培养基加 IPTG* (+/-)	GEN	AMK	TOB	ETM	SPM	NTL
BL21(DE3)/pET28a	+	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25
BL21(DE3)	+	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25
ATCC25922	+	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25
BL21(DE3)/pET28- <i>aac(3)</i> -II	-	2	≤ 0.25	1	≤ 0.25	≤ 0.25	1
BL21(DE3)/pET28- <i>aac(3)</i> -II	+	64	≤ 0.25	4	≤ 0.25	≤ 0.25	4
WZ30**	+	256	128	16	128	32	16

*IPTG 为诱导剂, 只对克隆了目的基因的重组菌有诱导作用。**WZ30 为临床筛选的对各种氨基糖苷类抗生素都具有较高耐药性的菌株。

表2 重组酶降解不同时间后 AGs 产物的抑菌实验

	0 s	10 s	20 s	30 s	40 s
GEN	-	+++	+++	+++	+++
TOB	-	+	++	+++	+++
NTL	-	+	++	+++	+++

-: 不生长; +: 小于 100 个菌落, ++: 100~1000 个菌落; +++: 满视野。

照菌对 GEN、AMK、TOB、ETM、SPM、NTL 等 AGs 敏感。pET28-*aac(3)*-II/BL21(DE3)的 MIC: 在固体培养基中添加 1 μ mol/ml 的 IPTG 时, 对 GEN、TOB、NTL 都有最高的 MIC; 不添加 IPTG 时, 对 GEN、TOB、NTL 有较低的耐药性。该结果表明诱导后重组质粒成功表达有活性耐药酶, 使重组菌的耐药性提高, 其对 GEN 的 MIC 提高了 256 倍, 对 TOB 和 NTL 的 MIC 提高了 16 倍, 但相比基因来源的天然菌底物谱缩小, MIC 也有所降低(表 1)。

2.5 重组酶降解 AGs 产物的抑菌实验

80 μ g GEN 溶液在重组 AAC 和乙酰辅酶 A 的作用下, 10 s 内 GEN 就被完全乙酰化而失去抑菌作用, 80 μ g TOB 和 NTL 在重组 AAC 和乙酰辅酶 A 的作用下, 30 s 被完全乙酰化而失去抑菌作用(表 2)。

3 讨论

3.1 AAC 的应用

本课题组对 ESBL 耐药酶的开发已进入后期研究, 有望开发成为 β -内酰胺类抗生素伴侣。同样, 本研究成功表达纯化的 AAC(3)-II, 为开发 AGs 伴侣打下坚实基础。

进一步寻找 AAC 的应用, 我们认为其在药物致聋治疗方面也有潜在的应用价值。据统计, 中国药物致聋者约 600~1 000 万, 药物中以 GEN 为代表的 AGs 致聋最为常见, Li 等^[5]调查发现温州地区的聋哑学校学生中药物性耳聋比例达到 48%。根据磷酸酯

肌醇学说, AAC 有望开发成为 AGs 新型解毒药, 该学说认为: AGs 进入耳蜗和前庭毛细胞蓄积后, 其氨基与细胞上的磷酸酯肌醇的磷酸基结合形成复合物, 导致细胞膜对离子非特异性渗透的改变, 引起细胞功能障碍或死亡, 最终导致患者耳聋。据此学说, 表达、纯化数种对 AGs 不同位点的氨基有乙酰化作用的混合 AAC, 注射该酶封闭 AGs 致病位点, 有可能降低 AGs 对耳蜗毛细胞的损害作用。

3.2 AAC 活性检测

AAC 的活性通过一定条件下, 降解 AGs 的量来体现, 常规测 AAC 活性的方法主要有微生物法、荧光法、放射免疫法^[6-7]等。荧光法、放射免疫法等底物浓度较低时精确, 但不适用高浓度底物浓度。而采用 MIC 法检测 AAC 的活性时底物浓度范围较广, 且较为直观地反映细菌对抗生素的耐药性。通过比较不同菌株的对 AGs 的 MIC 值, 反映出工程菌对 GEN 的降解活性提高了 256 倍, 对 TOB 及其 NTL 提高了 16 倍。重组酶降解 AGs 的抑菌实验证明, AAC 对 GEN 作用 10 s 即可使其降解, 而 TOB 和 NTL 在 20 s 内降解。这可能是由于 GEN 空间结构较简单, 其 3 位氨基较容易受到 AAC 的作用, 而 TOB 和 NTL 空间结构较复杂, 与 AAC 作用的位点不易马上受到攻击, 因此, 产生了时间上的滞后性。

3.3 重组酶活性的分析及其提高

本研究的结果表明含重组质粒 pET28-*aac(3)*-II 的细菌, 经过 IPTG 持续的诱导后对 GEN、TOB、STM 耐药性有较大的提高, 但是与基因来源的天然菌相比, MIC 降低, 底物谱缩小。其原因可能是: ①基因来源的天然菌可能同时存在数种 AGs 耐药机制, 而重组 pET28-*aac(3)*-II/BL21 菌仅为细菌产生钝化酶一种机制。天然菌对 AGs 耐药的机制有产生钝化酶、靶位点碱基突变、细菌细胞膜通透性改变、胞主动外排机制启动。②重组酶和天然酶的立体结构

存在一定的差异,导致重组酶活性有一定的下降。

针对这两种可能的情况,可通过体外定向进化技术(易错 PCR、DNA 改组等)提高酶活性及其拓展酶的底物谱。这些技术已有成功应用的实例,如 Zaccolo 等^[8]利用定向进化技术将 TEM-1 β -内酰胺酶对头孢噻肟活性提高了 2 383 倍, Kim 等^[9]利用易错 PCR 结合筛选技术将 TEM-1 β -内酰胺酶底物谱扩大,对部分底物活性提高。倘若用定向进化技术对 *aac*(3)-II 基因的改造后,再经过若干轮筛选可得到活性更高、底物谱更广的 *aac*(3)-II 突变基因,再重新克隆表达该酶基因,得到的酶产物显然更能满足产业化

的要求。随着后续工作的展开, AAC 作为一种新型的 AGs 伴侣的可行性将进一步得到证实。

参考文献(References)

- [1] Vetting MW *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 2005, **433**: 212
- [2] 姚 蕾等. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, **25**: 727
- [3] 丁 倩. *天津药学*, 2005, **17**: 56
- [4] 彭少华等. *中国人兽共患病杂志*, 2004, **20**: 413
- [5] Li Z *et al.* *Hum Genet*, 2005, **117**: 9
- [6] Stead DA *et al.* *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, **693**: 415
- [7] Vetting MW *et al.* *Chem Biol*, 2004, **11**: 565
- [8] Zaccolo M *et al.* *J Mol Biol*, 1999, **285**: 775
- [9] Kim JR *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 2006, **446**: 44

Expression and Purification of AAC(3)-II, a Aminoglycoside Acetyltransferase, and Its Activity

Zhen Wang^{1,2}, Yun-Bo Chen^{1,2}, Chang-Sen Zha^{1,2}, Li-Lin Zou^{1,2}, Ying Peng^{1,2},

Jing-Zhang Ji^{1,2}, Xiu-Shu Chen³, Jian-Xin Lü^{1,2*}

(¹Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, ²Institute of Cellular and Molecular Medicine,

³Institute of Microecology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract The *aac*(3)-II was amplified by PCR and cloned into pET28a expression plasmid, then the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3), lastly AAC(3)-II was purified from the recombinant bacteria. The activity of AAC(3)-II was analyzed by comparing minimum inhibitory concentration (MIC) between the recombinant bacteria owning *aac*(3)-II and not. Bacteria were disrupted by ultrasonic treatment. Bacteria debris was removed by centrifugation, and the supernatant and AAC(3)-II purified from the supernatant were analyzed by SDS-PAGE and Western Blot electrophoresis. Results demonstrated that the bacteria owning *aac*(3)-II were 256-fold higher in gentamicin (GEN) MIC, 16-fold higher in tobramycin (TOB) and netilmicin (NTL) MIC than the bacteria not owing *aac*(3)-II. SDS-PAGE and Western blot electrophoresis proved purified protein was AAC(3)-II that its molecular weight was 32.0 kDa, purity of that was more than 95 percentage. The purified 10 μ g AAC(3)-II transferred acetyl to GEN in 10 s, to TOB and NTL in 30 s, so the antibiotics were invalidated. The research provided fundamental conditions for exploiting the drug eliminating aminoglycosides.

Key words AAC; minimum inhibitory concentration; purification; aminoglycoside

Received: June 20, 2006 Accepted: October 19, 2006

This work was supported by the Key Program of Science and Technology Department of Zhejiang Province (No.2004C23018)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689805, Fax: 86-577-86689776, E-mail: ljx@wzmc.net