

肺炎克雷伯菌耐氨基糖苷类抗生素基因

aac(3)-I 的改构与功能

查长森 王震 吕建新* 陈云波 邹立林 季敬璋 彭颖 明镇寰

(温州医学院细胞与分子医学研究所, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 研究氨基糖苷乙酰转移酶基因 *aac(3)-I* 碱基变异与功能的关系。构建表达载体 pET28a-*aac(3)-I*, 转化感受态细胞 *E.coli* BL21(DE3), 筛选到阳性克隆送测序。然后在体外对 *aac(3)-I* 基因进行易错 PCR 改造, 筛选到一株阳性克隆测序后发现 7 处碱基变异, 其中 C272T、T373C 引发了氨基酸的变异, 分别对应: Ser91Phe、Tyr125His。以琼脂稀释法检测不同克隆的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。实验结果表明变异株 MIC 较突变前下降 64 倍(庆大霉素)、4 倍(阿米卡星)、8 倍(依替米星)。为进一步了解和阐明耐药酶 AAC(3)-I 与底物的作用机制打下基础。

关键词 *aac(3)-I*; 易错 PCR; 最低抑菌浓度

氨基糖苷类抗生素(aminoglycoside antibiotics, AGs)作为一类高效、广谱、廉价抗生素, 自 1944 年发现以来, 广泛运用于临床等各领域, 在抗感染等方面发挥了重大作用^[1]。但是自上世纪九十年代以来, 由各种原因而导致的细菌耐药性和耐药率大大增加, 很大程度上限制了这类抗生素的应用。国内外研究表明, 细菌对 AGs 耐药的主要原因是细菌携带并活化了能修饰此类抗生素的钝化酶(aminoglycoside modifying enzymes, AMEs)基因, AMEs 主要有三类: 氨基糖苷乙酰转移酶(aminoglycoside acetyltransferases, AACs)、氨基糖苷磷酸转移酶(aminoglycoside phosphotransferases, APHs)和氨基糖苷核苷转移酶(aminoglycoside nucleotidyltransferases, ANTs or AADs)^[2]。依据 AMEs 修饰位点不同, 每一类酶又分为多种型及其亚型, 各型有不同的耐药表型, 相同的表型还可由不同的基因编码。如 AAC 有 AAC(3)、AAC(6)、AAC(2')等型(括号内的阿拉伯数字代表抗生素分子上被修饰的氨基位点), 同时 AAC(3)又有多种亚型, 如: I、II、III 等^[3]。

目前针对钝化酶的修饰作用主要采取以下两种措施: (1)改造原有 AGs 的结构逃避钝化酶的修饰; (2)开发钝化酶抑制剂。这就需要对 AGs 的作用机制和钝化酶的修饰机制进行研究, 从分子水平阐明耐药机制, 在已有生物信息基础上运用三维结构预测软件, 模拟 AGs 与钝化酶间的相互作用, 推理设计出钝化酶抑制分子^[4,5]。钝化酶 AAC(3)-I 的作用底物为临床上

常用的庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星等, 本实验通过体外改构筛选到有活性差异的钝化酶 AAC(3)-I, 为进一步研究其与底物间相互作用的空间构象和设计钝化酶抑制分子打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

耐两种或两种以上 AGs 的肺炎克雷伯菌(由温州医学院第一附属医院检验科细菌室周铁丽老师提供), 质粒 pET28a(+), 工程菌 *E. coli* BL21(DE3) 和标准菌株 ATCC25922 为本实验室保存。

1.2 试剂和仪器

庆大霉素(gentamycin, GEN)、阿米卡星(amikacin, AMK)和依替米星(etimicin, ETM)药粉购自英国 Oxoid 公司; DNA 胶回收试剂盒、Pyrobest DNA 聚合酶、Taq™ DNA 聚合酶、质粒小提试剂盒、NcoI 和 XhoI 限制性内切酶、dTTP 和 dCTP 购自大连宝生物公司; 1 kb DNA ladder marker 购自上海晶美公司; MH 琼脂购自杭州天和微生物试剂公司; PCR 扩增仪为 Bio-Rad 公司产品; 10 × 易错 PCR 缓冲液: 内含 4.4 mmol/L MgCl₂、500 mmol/L KCl、100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)、0.1% 明胶; 5 mmol/L

收稿日期: 2006-11-23 接受日期: 2007-02-13

浙江省科技厅重点项目(No.2004C23018)

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

ljj@wzmc.net.

MnCl₂(以上试剂为分析纯)。

1.3 引物设计

根据GenBank上登录的*aac(3)-I*基因序列设计引物,结果经Primer Premier5.0和Blast分析。上游引物:5' TACCATGGGCATCATTCGCACATGGC 3'和下游引物:5' TTTCTCGAGTTAGGTGGCGGTACT-TGGGTC 3',分别在5'端引入NcoI和XhoI酶切位点(下划线所示)。下游引物保留终止子。

1.4 DNA模板的制备

采用质粒小提试剂盒提取(步骤见说明书)。

1.5 常规PCR反应

PCR反应总体积50 μl,其中5.0 μl 10×Pyrobest缓冲液,每种dNTP各0.2 mmol/L,引物P各0.2 μmol/L,1.25 U Pyrobest DNA聚合酶,质粒DNA模板4 μl,反应条件:95 °C预变性5 min;94 °C变性1 min,55 °C退火1 min,72 °C延伸1 min,35个循环;72 °C延伸10 min后结束反应。PCR产物和pET28a经NcoI和XhoI双酶切,胶回收后连接过夜,转化感受态细胞*E. coli* BL21(DE3),筛选阳性克隆并测序,该克隆称pET28a-*aac(3)-I*/BL21。

1.6 易错PCR反应^[6-9]

易错PCR反应总体积50 μl,其中5.0 μl 10×易错PCR缓冲液,dCTP和dTTP为1.25 mmol/L,dATP和dGTP为0.25 mmol/L,Mg²⁺浓度5.44 mmol/L,Mn²⁺浓度0.5 mmol/L,引物各0.2 μmol/L,2.5 U TaqTM DNA聚合酶,以常规PCR产物5.0 μl为模板。易错PCR反应条件:95 °C预变性5 min;94 °C变性45 s,53 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,40个循环;72 °C延伸10 min后结束反应。同上方法筛选阳性克隆并测序,该克隆称pET28a-*aac(3)-I^E*/BL21。

1.7 AAC(3)-I在细菌中的表达

分别将含有pET28a-*aac(3)-I*和pET28a-*aac(3)-I^E*质粒的BL21大肠杆菌,接种到卡那霉素(25 μg/ml)的LB培养基中置于摇床上37 °C,250 r/min培养16 h,然后按1:20接种,37 °C,250 r/min再培养3 h,至A₆₀₀值为0.6左右,加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为0.5 mmol/L。在25 °C,250 r/min诱导培养4 h。在IPTG诱导后分别取样,用作SDS-PAGE分析。

1.8 最低抑菌浓度(MIC)的测定

根据美国临床实验室标准化委员会标准,以琼脂稀释法测定MIC。选择标准菌株ATCC25922为质控菌、以空质粒pET28a(+)转化*E. coli* BL21(DE3)

得到pET28a/BL21为阴性对照,分别选择1.7步骤中处理的细菌测定酶活性:pET28a-*aac(3)-I^E*/BL21(0.5 mmol/L IPTG诱导前)、pET28a-*aac(3)-I^E*/BL21(0.5 mmol/L IPTG诱导后)、pET28a-*aac(3)-I*/BL21(0.5 mmol/L IPTG诱导前)、pET28a-*aac(3)-I*/BL21(0.5 mmol/L IPTG诱导后)。

2 结果

2.1 PCR扩增和重组子的鉴定

扩增到的阳性条带与预期相符(465 bp),获得的重组子质粒经NcoI和XhoI双酶切后产生的片断大小约为5 200 bp,与预期结果一致(图1)。

2.2 测序结果分析

通过Blast比对分析,重组质粒pET28a-*aac(3)-I*测序结果与GenBank注册号AF282595的100%同源。重组质粒pET28a-*aac(3)-I^E*测序表明有7处碱基变异(与AF282595相比较),其中272位C→T和373位T→C引起了氨基酸的变异,分别是:Ser91Phe、Tyr125His,如图2所示。

2.3 SDS-PAGE结果(图3)

在相同条件和诱导剂浓度的作用下,耐药酶AAC(3)-I和AAC(3)-I^E的表达量及分子大小(图3),AAC(3)-I和AAC(3)-I^E约为17.0 kDa(与预期相符)。

2.4 MIC的测定

以ATCC25922为质控,以空质粒pET28a(+)转化*E. coli* BL21(DE3)得到pET28a/BL21为阴性对照,MIC见表1。

3 讨论

研究者一方面对现有的抗生素进行有效的改造,

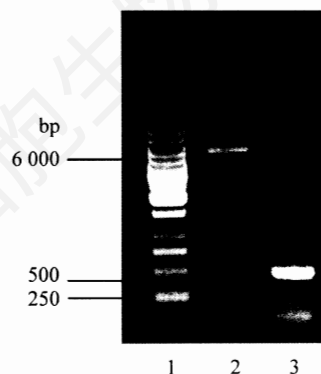


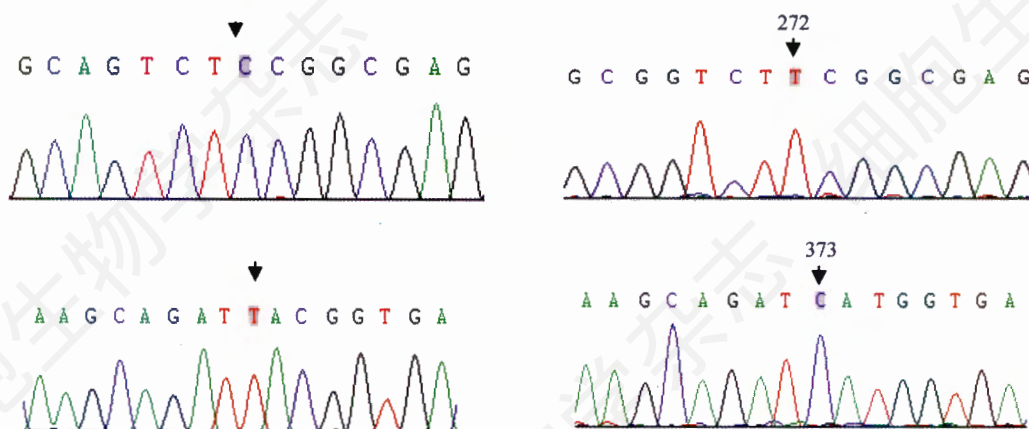
图1 *aac(3)-I*基因PCR扩增产物和重组子pET28a-*aac(3)-I*的NcoI和XhoI双酶切电泳图

1: 1 kb DNA ladder marker; 2: 重组子质粒的酶切; 3: *aac(3)-I*基因PCR产物。

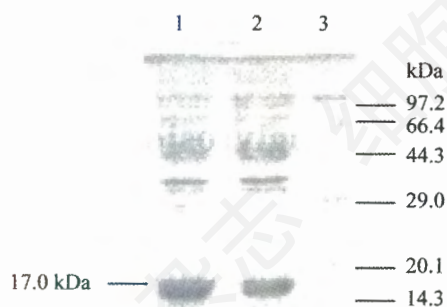
表 1 多种细菌对不同 AGs 的 MIC(单位: $\mu\text{g/ml}$)

菌株	庆大霉素	阿米卡星	依替米星
ATCC25922	2	1.6	0.8
pET28a/BL21	2	1.6	0.8
pET28a- <i>aac(3)-I^E</i> /BL21(0.5 mmol/L IPTG 诱导前)	2	1.6	0.8
pET28a- <i>aac(3)-I^E</i> /BL21(0.5 mmol/L IPTG 诱导后)	2	1.6	0.8
pET28a- <i>aac(3)-I</i> /BL21(0.5 mmol/L IPTG 诱导前)	4	3.2	1.6
pET28a- <i>aac(3)-I</i> /BL21(0.5 mmol/L IPTG 诱导后)	128	6.4	6.4

^E 为碱基突变的 *aac(3)-I*。

图 2 pET28a-*aac(3)-I* 和 pET28a-*aac(3)-I^E* 测序图

左边为 pET28a-*aac(3)-I* 测序图, 右边为 pET28a-*aac(3)-I^E* 测序图。

图 3 终浓度(0.5 mmol/L)的 IPTG 诱导 AAC(3)-I 和 AAC(3)-I^E 表达的 SDS-PAGE 图

1: pET28a-*aac(3)-I^E*/BL21 表达的蛋白质; 2: pET28a-*aac(3)-I*/BL21 表达的蛋白质; 3: 低分子量蛋白质标准。

以减少酶的识别而仍然保持其内在活性, 另一方面通过设计钝化酶抑制剂以提高氨基糖苷类抗生素在临床上应用。Daigle 等^[9]研究的数据表明 APHs 专门作用于真核生物蛋白激酶(EPKs)的底物丝氨酸残基, 得出 APHs 是丝氨酸蛋白激酶的结论。曾有报道 EPKs 抑制剂可有效抑制 APH(3')-IIIa 和 AAC(6')-APH(2''), 提示氨基糖苷类酶可以磷酸化 EPKs 的底物。这启发了应用蛋白酶抑制剂抵抗修饰酶对氨基糖苷类

图 4 预测的 AAC(3)-I^E 结构图

绿色表示第 91 位氨基酸由 Ser → Phe 的位点, 红色表示第 125 位氨基酸由 Tyr → His 的位点。



图 5 PDB1B04 与乙酰辅酶 A 相互作用的结构图

箭头所指为乙酰辅酶 A, 蓝色表示模体 A; 紫色表示模体 B; 红色表示模体 C; 绿色表示模体 D。

化作用。研究表明新酶胺的一系列溴乙基化衍生物能共价修饰APH(3)-IIIa的Glu3和Asp23,使之失活^[10]。

依据本实验的结果(表1所示)表明:通过体外改构得到的AAC(3)-I^E活力较突变前有较大下降。在相同诱导条件下AAC(3)-I^E和AAC(3)-I在宿主菌BL21中表达量相同,且它们的N末端和C末端不携带任何多余的氨基酸(因起始子存在于酶切位点上、下游引物引入了终止子),同时又测定了质控菌和阴性对照菌的MIC,所以克隆的菌株可以体现酶活力。变异株MIC较突变前下降64倍(GEN)、4倍(AMK)、8倍(ETM)。将此序列提交ESypred3DWebServer1.0进行三维空间结构预测(预测结果提示:以1B04的'B'链为模,目的蛋白与模在空间构象有81.4%的相似性),经spdbviewer3.7软件分析处理(图4)^[11]。

据文献报道参考蛋白PDB1B04的二级结构由3个短的、1个长的 α 螺旋和6个 β 折叠组成。这些结构组合形成了4个模体(motif):模体A是最保守的空间结构,为乙酰辅酶A(AcCoA)结合位点;模体B自身成发夹样结构,镶嵌在6个 β 折叠之间形成酶的活性中心;模体C形成一疏水区;在模体A和模体C之间形成的疏水区称为模体D。文中对PDB1B04与底物乙酰辅酶A间的相互作用作了X射线晶体衍射(图5)^[12]。

通过分析比较AAC(3)-I^E和PDB1B04与乙酰辅酶A相互作用的空间结构,不难发现改构后得到的AAC(3)-I^E上的Ser91Phe位为模体A,这一变异影响了乙酰辅酶A的结合,苯丙氨酸较丝氨酸空间位组可能也是影响因素;Tyr125His位为模体B上,影响了酶的催化活力。以上只是一种猜想,具体验证需得到纯化酶再运用X射线晶体衍射法。总之,2个点氨基酸的变异导致酶功能的改变,为我们下一步研究或将来的药物开发和钝化酶抑制剂分子的设计打下了基础,如采用定点突变的方法分别突变单个氨基酸,比较酶活性的改变,能更清晰地了解耐药酶AAC(3)-I与底物的作用位点。

参考文献(References)

- [1] Mingeot-Leclercq MP *et al. Antimicrob Agents Chemother*, 1999, **43**: 727
- [2] 陈接根等. *遗传*, 2004, **26**: 202
- [3] Riccio M L *et al. Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47**: 1746
- [4] Pourreza A *et al. Antimicrob Agents Chemother*, 2005, **49**: 2979
- [5] Burk DL *et al. Protein Sci*, 2003, **12**: 426
- [6] Morley KL *et al. Trends Biotechnol*, 2005, **23**: 231
- [7] 陈晓穗等. *第二军医大学学报*, 2003, **24**: 307
- [8] 王正祥等. *生物工程学报*, 2000, **16**: 301
- [9] Daigle MD *et al. Chem Biol*, 1999, **6**: 11
- [10] 郑卫. *国外医药抗生素分册*, 2000, **21**: 57
- [11] He H *et al. J Mol Biol*, 2003, **325**: 1019
- [12] Wolf E *et al. Cell*, 1998, **94**: 439

Reconstruction and Function of *aac(3)-I*, an Aminoglycoside Resistant Gene from *Klebsiella pneumoniae*

Chang-Seng Zha, Zhen Wang, Jian-Xin Lu, Yun-Bo Chen, Li-Lin Zou, Jing-Zhang Ji, Yin Peng, Zhen-Huan Ming
(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Institute of Cellular and Molecular Medicine,
Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract To study on the mutation of aminoglycoside acetyltransferase gene *aac(3)-I* and its function, expression vector pET28a-*aac(3)-I* was constructed, then transformed into competent *E. coli* BL21(DE3). One positive clone was sequenced. The *aac(3)-I* was reconstructed *in vitro* by error-prone PCR. A clone by antibiotics screening was sequenced. The result demonstrated that the gene had 7 bases mutate, on the site of C272T, T373C the amino acids have varied to Ser91Phe, Tyr125His. Agar dilution tests were performed to detect the minimum inhibitory concentration (MIC) of different clone strains. The MIC of the mutational clone was lower 64 times (gentamicin), 4 times (amikacin), 8 times (etimicin) than the wild strain. This study provided the fundamentals to further comprehend and elucidate the mechanism of interaction between AAC(3)-I and substrate.

Key words *aac(3)-I*; error-prone PCR; minimum inhibitory concentration

Received: November 23, 2006 Accepted: February 13, 2007

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

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