维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)04-0519-03

金属 β-内酰胺酶(IMP-1)的表达,纯化和鉴定

丁世家[1],邱宗荫[1],山口佳宏[2],后藤正文[2]

(1.重庆医科大学医学检验系,重庆 400016;2.熊本大学药学系)

【摘 要】目的:建立金属 β-内酰胺酶 IMP-1 的表达,纯化和鉴定方法,并探讨实验条件对分离纯化的影响。方法:pET9a/d-IMP-1 质粒转化至 *E. coli* Competent BL21(DE3) Cell 并在 LB 培养基中表达后,通过 SP Sepharose 离子交换柱,得到粗提物,浓缩后用 Sephadex G-75 凝胶柱进一步纯化,得到 IMP-1 的精提物,对纯化产物用 SDS-PAGE 和 MALDI-TOF-MS 进行鉴定,同时用 Nitrocefin 作底物,测定纯化的金属 β-内酰胺酶 IMP-1 的活性。结果:纯化的 IMP-1 具有较高的活性,能水解大多数抗生素。其米氏常数 K_m=9.28μmol/L;用 MALDI-TOF-MS 法测得的分子量为 M_r=25111.9。结论:本文建立了金属 β-内酰胺酶 IMP-1 的表达、纯化、鉴定方法,该法可用于其它的金属 β-内酰胺酶的表达和纯化。

【关键词】金属 β-内酰胺酶;IMP-1;MALDI-TOF-MS

【中国图书分类法分类号】R34 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-01-07

The expression, purification and characterization of metallo-β-lactamases(IMP-1)

DING Shijia, et al

(*Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish the method for the expression, purification and characterization of metallo-β-lactamases(IMP-1) and to explore the influence of experimental conditions on its separation and purification. *Methods*: pET9a/d-IMP-1 plasmid was transformed into *E. coli* competent BL21(DE3) cell and inoculated in LB medium. The supernatant were applied to SP Sepharose Fast Flow column, following by Sephadex G-75 column, and the purified enzymes were identified by SDS-PAGE and MALDI-TOF-MS and their activity was determined using Nitrocefin as substrate. *Results*: The purified enzyme showed high catalytic activity in the hydrolysis of most antibiotics. Its Michaelis constant K_m=9.28μmol/L, and molecular weight Mr equalled 25111.9(determined by MALDI-TOF-MS). *Conclusion*: The method was established for the expression, purification and characterization of metallo-β-lactamases(IMP-1), which can be applicable to other metallo-β-lactamases.

【Key words】Metallo-β-lactamases; IMP-1; Matrix assisted laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)

β-内酰胺类化合物能抑制细菌细胞壁的构建,而被广泛地用作感染性疾病治疗首选药物,但随着该类抗生素大量使用,临床上产生了耐药菌株,其主要原因之一就是细菌中 β-内酰胺酶的存在。Bush 将该酶分为四类:A、B、C 和 D[1]。A、C、D 类 β-内酰胺酶活性部位有一个丝氨酸残基,因而被称为丝氨酸—内酰胺酶,B 类 β-内酰胺酶是一组活性部位为金属离子且必须依赖少数金属离子(主要为 Zn^{2+})的存在而发挥催化活性的酶类,所以被称为金属 β-内酰胺酶(MBLS)。目前超过 15 种金属 β-内酰胺酶的氨基酸序列已经测定,按其结构和水解底物的特异性,可将其分为 B_1、B_2、B_3 亚类[2]。金属 β-内酰胺酶水解大多数 β-内酰胺类抗生素,包括不被丝氨酸 β-内酰胺酶降水解的碳青霉烯类抗生素,同时 MBLS 不能被常见的 β-内酰胺酶抑制剂(如克拉维酸)所抑制。IMP-1 是目前所有金属 β-内酰胺酶研究中的热点,自上世纪 90 年代以来,日本首次发现粘质沙雷菌 TN9106 的 IMP-1 基因后,又相继发现其他粘质沙雷菌,铜绿假单胞菌,肺炎克雷伯菌,枸橼酸弗劳地菌,洋葱伯克霍德尔菌,施化假单胞菌和木糖氧化产碱菌携带与 IMP-1 相

作者介绍:丁世家(1963-),男,副教授,
主要研究方向:生物分析化学和生物质谱。

基金项目:本研究受到日本政府贷款《重庆市高等教育项目》资助。

维普资讯 http://www.cqvip.com

似的等位基因[3~5]。近年在欧洲、新加坡、韩国、中国也发现了带 IMP 基因的革兰氏阴性杆菌[6,7],它们位于质粒上,耐药性呈水平传递。本文在国内首次建立金属 β-内酰胺酶 IMP-1 的纯化方法,并用 MALDI-TOF-MS 法测定金属 β-内酰胺酶分子量,同时也研究了纯化的 IMP-1 的酶学特征。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂

$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, Tris-HCl 缓冲溶液,三氟乙酸(TFA),乙腈,磷酸盐缓冲溶液购自美国 SIGMA 公司;头孢硝噻吩(nitrocefin)购自英国 GLAXO 公司;本实验所用其它抗生素均来自日本制药公司。异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)溶液:称取 2g IPTG(MW238.3)加入蒸馏水 8ml 溶解后,定溶于 10ml,超滤除菌置 -20℃ 保存。Luria—Bertani(LB)液体培养基和固体培养基按常规配制。

1.2 pET9a/d-IMP-1 质粒(日本国立感染研究所)

1.3 IMP-1 的制备

将 pET9a/d-IMP-1 质粒通过热冲击转化至 *E·coli* Competent BL21(DE3) Cell 中,涂布于含 30mg/ml 氨苄西林的 LB 固体培养基中,37℃ 过夜培养,挑选单一菌落,将菌落用不锈钢环接种于含 50mg/ml 氨苄西林的的 5ml LB 液体培养基中,37℃ 150r/min 振摇,培养 4h;取上述培养菌体 5ml 转种于含 50mg/ml 氨苄西林的 15ml 液体培养基中,37℃ 150r/min 振摇,培养 5h 后取 15ml 培养菌体,转种于含有 50mg/ml 氨苄西林的 10l 液体培养基中,37℃ 150r/min 振摇培养 8h,当菌体生长至在波长 600nm 处吸光度值 A_{600} = 0.4~0.6 时,加入 1mol/L IPTG 500μl,37℃ 时 150r/min 振摇继续培养 4h;将上述培养液于 4℃ 时以 6000×g 离心 15min、去除上清液加入 50ml 50mmol/L pH7.0 磷酸盐缓冲溶液,用玻璃棒充分搅拌,在冰浴中超声裂解,其程序如下:5s超声裂解,静置 55s,重复 55 次后、将超声后溶液放入 Beckman 离心试管中 4℃ 下,150,40000×g 离心 75min。取离心后的溶液放入 SP Sepharose Fast flow column(φ26mm×10cm,安法玛西亚公司)中进行离子交换分离,在低温下(5℃),用 pH7.0 内含 2μmol/L $Zn(NO_3)_2$ 的 50mmol/L 磷酸钠缓冲溶液和氯化钠(浓度线性变化从 0 到 0.5mol/L,6h)溶液淋洗,洗脱样品用玻璃试管自动收集,洗脱液的流速为 60ml/h.每支试管体积为 5ml。

经对收集的试管进行吸光度测量及同底物头孢硝噻吩相互作用颜色改变,确认含有 IMP-1 的几支试管,混合这几支试管溶液,低温下(5℃)加到 Sephadex G-75 柱中,(φ50mm×80cm,安法玛西亚公司),用 pH7.4 内含 2μmol/L $Zn(NO_3)_2$ 和 0.3mol/L NaCl 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液,淋洗洗脱样品,经馏份收集器,用玻璃管收集不同时间,经凝胶柱后所得到的样品,每管 5ml,流速为 40ml/h。对收集样品进行吸光度测量及 SDS-PAGE 电泳,确认含有 IMP-1 的试管,混合这几支试管的溶液,经超滤后即可得到较高纯度的金属 β-内酰胺酶 IMP-1。

1.4 IMP-1 的活性测定

头孢硝噻吩作底物,用岛津 UV—2200 分光光度计在 50mmol/L Tris—HCl,0.5mol/L NaCl(pH=7.4)中,30℃ 时通过测定波长为 491nm 时、吸光度改变得到 A-t 曲线来计称 IMP-1 活性,$\Delta\varepsilon_{491nm} = 20000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$,摩尔活性常数 K_{obs} 通过下面公式进行计算。

$K_{obs} = V_{init}/[E]_T$

V_{init}:起始反应速度

$[E]_T$:金属 β—内酰胺总浓度

1.5 IMP-1 的 MALDI—TOF—MS 分析

在进行 MALDI—TOF—MS 分析之前,先必须对蛋白质脱盐,其过程如下:先用 0.1% TFA/50% 乙腈溶液通过加样枪淋洗 Zip Tip C_{18}(Millipore) 50 次,后用 0.1% TFA/10% 乙腈平衡 Zip Tip C_{18}(50 次),将平衡后的 Zip Tip C_{18} 抽吸样品溶液 100 次之后,用 0.1% TFA 洗脱样品中的盐类化合物,最后用 10μl 0.1% TFA/10% 乙腈将蛋白质从 Zip Tip C_{18} 固定相中洗下来(50 次),用于质谱分析。用 Bruker Ref lex™. MALDI-TOF MS 进行质谱分析,所用基质为 3.5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸,激发光波长为:N_2 激光 337nm。

2 结 果

2.1 细菌裂解物经 SP-Sepharose 离子交换柱后的 IMP-1 粗提物的鉴定

细菌超声裂解液经低温高速离心,上层液体经 SP-Sepharose 离子交换柱后,通过馏份收集器,得到不同时间柱后所收集的样品,将玻璃试管编号从 1 到 100,每支试管收集 5ml,可以用下面二种方法鉴定每支试管中 IMP-1 的含量,其一是向每支试管中加入 10μl 3.1mmol/L 的头孢硝噻吩溶液,观察颜色变化,颜色越深,表明该试管所含 IMNP-1 越多;其二是测定每支试管在波长为 280nm 和 400nm 的吸光度。

从研究结果可以看出,从编号 40 开始,到 54 号试管,其吸光度有一峰值,所以混合 40 号到 54 号管的粗提液经浓缩后进一步纯化。

2.2 粗提物经 Sephadex G-75 凝胶柱后 IMP-1 的鉴定

粗提物经 Sephadex G-75 凝胶柱后,得到不同

维普资讯 http://www.cqvip.com

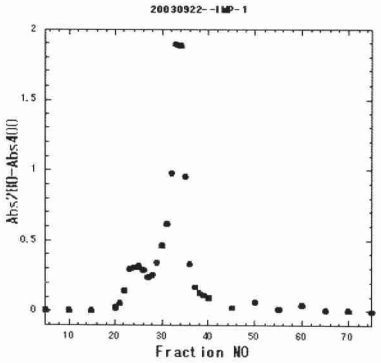


图 1 经 Sephadex G－75 柱，吸光度对馏份关系曲线，纵坐标：280nm 处吸光度，横坐标：不同编号的馏份。

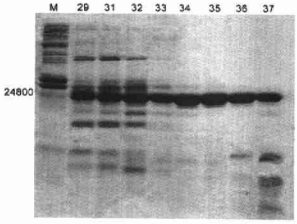


图 2 经 Sephadex G－75 柱后，不同时间收集的馏份的 SDS－PAGE 图：从左到右，对应的试管编号为 Marker、29、31、32、33、34、35、36、37 号。

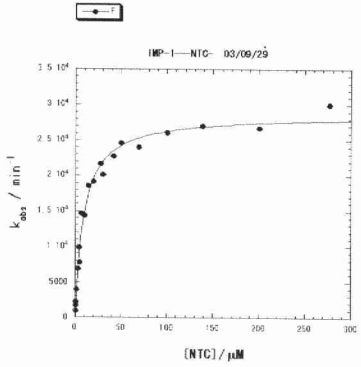


图 3 K_{obs}对 Nitrocefin 关系曲线，纵坐标：K_{obs}横坐标：底物 Nitrocefin 浓度

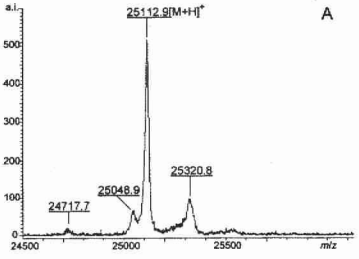


图 4 10μl 纯化的 IMP－1 样品经 ZipTip C18 处理后的 MALDI－TOF－MS 图

时间收集到的馏份(将试管编号从 1 到 120，每支试管收集 5ml)。测定各个馏份在波长 280nm，400nm 的吸光度，得到 A280－400 对馏份的关系图(图 1)。从图中可以看到，经凝胶柱后，蛋白质得到很好的纯化，IMP－1 主要集中在编号为 29 到 40 号的试管中。

为了进一步确证各个馏份中 IMP－1 的含量和纯度，对馏份进行 SDS－PAGE 实验(图 2)。

从图中可以看到，编号 32 到 35 号试管，IMP－1 的含量最高，同时几乎没有杂带，IMP－1 同其它蛋白质得到了很好的分离，混合 32 到 35 号试管的溶液，经浓缩后即得到所需 IMP－1 纯品。

2.3 IMP－1 活性的测定

用上述方法得到的 IMP－1 精提物，按前述方法，测定同不同浓度的底物头孢硝噻吩相互作用的 A－T 曲线，从曲线上计算出反应初速度及 K_{obs}即可得到 K_{obs}～C_{NTC}曲线，(图 3)。

按 Michaelis 方程对上述曲线进行回归，可得到 K_m＝9.28μmol/L，这与文献报道是一致的[8]。

2.4 IMP－1 的分子量的测定

取 10μl 纯化的 IMP－1 溶液，用前述方法测定其质谱图(图 4)。

从质谱图上可以看到，其分子量为[M＋H]$^+$＝25112.9 与文献十分相符[8]，同时从谱图可知，杂质峰较少，且很小，说明所得到的 IMP－1 纯度较高。

3 讨 论

近年来在国内外均有金属 β－内酰胺酶的报道，研究结果显示：IMP－1 基因能通过质粒水平传播，而由于 IMP－1 具有比丝氨酸 β－(下转第 529 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

11714.

[3] Morimoto M, Irimura T. Fibroblast migratory factor derived from mouse colon carcinoma cells: potential roles of fibronectin in tumor stroma formation[J]. J Cell Biochem, 2001; 80(4):635 - 646.

[4] 王小毅,任国胜,石 远,等。透明质酸酶及肝素对血管生成影响的实验研究[J]. 重庆医学,2003;32(2):130 - 131.

[5] Bruns CJ, Liu W, Davis DW, et al. Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma[J]. Cancer, 2000; 89 (3):488 - 499.

[6] Pallini R, Pierconti F, Falchetti ML, et al. Evidence for telomerase involvement in the angiogenesis of astrocytic tumors: expression of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA by vascular endothelial cells[J]. J Neurosurg, 2001; 94 (6):961 - 971.

[7] Waltenberger J, Claessonwelsh L, Siegbahn A, et al. Different signal transduction properties of KDR and Flt - 1, Two receptors for vascular endothelial growth factor [J]. J Biol Chem, 1994; 269:26988 - 26995.

[8] Asto Y. Transcription factor ETS - 1 as a molecular target for angiogenesis inhibition[J]. Hum Cell, 1998; 11(4):207 - 214.

[9] Croix BS, Rago C, Velculescu V, et al. Genes expression in human tumor endothelium [J]. Science, 2000; 289: 1197 - 1202.

[10] Shekhar MPV, Werdell J, Santner SJ, et al. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implictions for tumor development and progression[J]. Cancer Res, 2001; 61(4):1320 - 1326.

(上接第 521 页)内酰胺更广泛的底物,这预示着今后几年金属 β - 内酰胺酶对临床上抗生素的广泛使用,有更大的抑制作用[9],因此,建立 IMP - 1 表达,纯化,鉴定方法,对于研究酶的功能,及其与抗生素之间相互作用机理,寻找更有效的抑制剂,具有十分重要的理论和实际意义。

研究结果显示,为了提高 IMP - 1 的产率及保持酶的活性,在液体培养基和柱层析中,均应加入 $Zn(NO_3)_2$ 溶液。对柱层析时不同缓冲溶液对分离效果的影响研究表明,磷酸盐缓冲溶液和 Tris - HCl 缓冲溶液对分离效果影响不明显,但是 pH 对分离影响大。一般来讲,pH 应控制在 7.0 左右。我们也探讨了纯化的 IMP - 1 同其它抗生素相互作用的活性,研究结果表明,纯化的 IMP - 1 具有较高的活性,能水解大多数常见抗生素,如青霉素钠盐、头孢呋辛、头孢哌酮、头孢吡肟、头孢他啶、亚胺培南西、氨曲南、拉氧头孢、他唑巴坦、头孢噻肟。

用 MALDI - TOF - MS 测定 IMP - 1 分子量比 SDS - PAGE 准确度要高,同时从质谱图中可判断所纯化的金属 β - 内酰胺酶的纯度。但是在进行质谱分析中,样品的预处理及基质的选择十分重要,本文采用 Zip Tip C_{18} 即固相萃取的方法去掉样品中的盐类化合物,效果十分理想。

本文建立的 IMP - 1 纯化方法也可用于其它的金属 β - 内酰胺酶的表达及纯化。如:GOB, IMP - 2, IMP - 1 的突变体等。

参 考 文 献

[1] Bush K. Characterization of beta - lactamases[J]. Antimicrob. Agents Chemother., 1989; 33:259 - 263.

[2] Galleni M., Lamotte - Brasseur J, Rossolini G. M, et al. The metallo - β - lactamase working group, standard numberin scheme for class B β - lactamases [J] Antimicrob. Agents Chemoth., 2001; 45:660 - 663.

[3] Goto M., Takahashi T., Yamashita F., et al. Inhibition of the Metallo - β - lactamase produces from Serratia marcescens by thiol compounds[J]. Biol. Pharm. Bull., 1997; 20:1136 - 1140.

[4] Arakawa Y., Murakami M., Suizuki K., et al. A novel integron - like element carrying the metallo - β - lactamase gene blaIMP[J]. Antimicrob. Agents Chemoth., 1995; 39: 1612 - 1615.

[5] Hirakata Y., Izumikawa K., Yamaguchi T., et al. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple - drug - resistant gram - negative rods carrying the metallo - β - lactamase gene bla_{IMP} [J]. Antimicrob. Agents Chemoth., 1998; 42:2006 - 2011.

[6] Laraki N., Franceschini N, Galleni M., et al. Biochemical characterization of the pseudomonas aerugiosa 101/1477 metallo - beta - lactamase IMP - 1 produced by escherichia coli[J]. Antimicrob. Agents Chemoth., 1999; 43:902 - 906.

[7] Jing - Jou Yan, Hsueh PR, Ko WC. Metallo - beta - lactamases in clinical Pseudomonas isolates in Taiwan and identification of VIM - 3, a novel variant of the VIM - 2 enzyme[J]. Antimicrob. Agents Chemoth., 2001; 45:2224 - 2228.

[8] Moali C., Anne C, Galleni M, et al. Analysis of the importance of the metallo - β - lactamase active site loop in substrate binding and catalysis[J]. Chemistry & Biology, 2003; 10:319 - 329.

[9] 卓 超,钱元恕. 金属 - β 内酰胺酶的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册,2003;24:12 - 17.