维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)06－0707－04

伤寒沙门菌多重耐药 acrAB 全基因的检测及序列分析

余泽波[1], 姚　成[1], 肖永红[2], 蔡素芳[1]

(1. 重庆医科大学临床学院感染科,重庆　400016;2. 北京大学临床药理研究所,北京　100083)

【摘　要】目的:伤寒沙门菌 275 主动外排系统 acrAB 全基因测序并分析其结构。方法:以伤寒沙门菌基因序列为参考设计引物,以 PCR 法对伤寒沙门菌 275 acrAB 全序列进行调取并测序。结果:伤寒沙门菌 275 acrAB 全序列与参考伤寒沙门菌(No. AL627267)同源性 99.38%,与大肠杆菌(No. U00734)同源性 84.69%。伤寒沙门菌 275 acrR 正向编码 217 个氨基酸,acrA 反向编码 397 个氨基酸,acrB 反向编码 1049 个氨基酸,同参考伤寒沙门菌比较,acrR 相同,acrA、acrB 各一处不同;与大肠杆菌比较,同源性分别为 86.98%、91.69%、94.66%。acrA、acrR 启动区位于 4367～4507 碱基处,SD 序列(RBS)位于 4373～4377 碱基处。acrA 与 acrB 间隔区位于 3151～3172 碱基处,SD 序列(RBS)位于 3161～3165 碱基处。结论:伤寒沙门菌 acrAB 主动外排系统在结构、碱基序列和编码的氨基酸序列上均与大肠杆菌有很高的同源性,它可能是伤寒沙门菌引起多重耐药的主要原因。

【关键词】伤寒沙门菌;多重耐药;主动外排;acrAB

【中国图书分类法分类号】R516.3　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－03－05

Sequence analysis of multiple－antibiotic－resistant active efflux system gene acrAB of Salmonella typhi

YU Zebo, et al

(*Department of Infectious Diseases, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To identify the sequence of the multiple－antibiotic－resistant efflux acrAB gene in Salmonella typhi 275 (a clinically isolated strain) and analyze its structure, amino acid sequence. *Methods*: The whole acrAB gene of Salmonella typhi 275 were amplified by PCR with the primers designed from Genebank, and the sequence of products and the amino acid sequence were detected. *Results*: The whole sequence of acrAB gene of Salmonella typhi 275 contained 5156 bases and 99.38% identity were found in comparison with the reference sequence of Salmonella typhi (Genebank No. AL627267); 84.69% identity were detected in comparison with that of Escherichia coli (Genebank No. ECUO0734). The acrR, actA, acrB of Salmonella typhi 275 coded AcrR, AcrA, AcrB proteins with 217, 397 and 1049 amino acids, respectively. 1 amino acid alteration existed in both AcrA (Ser270Thr) and AcrB (Met964Thr) in comparison with the reference Genebank amino acids sequence. Compared with Escherichia coli, 28, 33 and 56 amino acids alteration and 86.98%, 91.69% and 94.66% identity in the AcrR, Acta and AcrB were found respectively. 2 additional amino acids existed in AcrR of Salmonella typhi 275. The promoter region of Acta and acrR was located in 4367－4507 bases and the SD sequence was in 4373－4377 bases. *Conclusion*: The multiple－antibiotic－resistant active efflux system gene acrAB of Salmonella typhi shows high homology in bases, amino acids and protein structure with that of Escherichia coli and it is the possible reason that Salmonella typhi is resistant to multi－antibiotics without similar chemical structure.

【Key words】Salmonella typhi; Multiple－antibiotic－resistance; Active efflux; acrAB

随着氟喹诺酮类药物临床的广泛应用,耐药沙门菌已有报道,并出现了多重耐药菌株[1,2],其机制主要与细菌中存在主动外排系统有关[3]。大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等多种细菌均报道存在抗菌药物的主动外排系统。研究表明,伤寒沙门菌有相应耐药机制,并可经过体外诱导使原来敏感的细菌产生多重耐药[4],为进一步研究该多重耐药主动外排基因及其调控基因的结构和功能,我们首先对诱导前的敏感菌株的多重耐药基因进行 PCR 全基因扩增及测序,同时为分析比较该基因在诱导前后是否存在突变及克隆表达作准备。

作者介绍:余泽波(1970－　),男,主治医师,硕士,
主要研究方向:感染性疾病、抗生素及细菌耐药机制

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970881)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 研究对象

伤寒沙门菌 275(S275)为我院 199o 年临床病人血培养分离所得对喹诺酮类敏感的菌株，试验前重新鉴定。

1.2 材料和仪器

1.2.1 分子生物学试剂 Taq™酶、Pyrobes™ DNA Polymerase、BKL Kit、E. Coli Competent JM109 Cell、pMD18－T VECTOR、Hind Ⅲ、Marker DL－2000 为宝生物工程(大连)有限公司产品。蛋白酶 K、琼脂糖凝胶、溴化乙锭、DNA 分子量标准、UNIQ－10 DNA 抽提纯化试剂盒为上海生物工程公司产品。

1.2.2 PCR－引物 参考 Genebank No. AL627267(括号内为相应序列号)碱基，序列均由宝生物工程(大连)有限公司成。

P1：5'GTGGGATCCTCAGCGATGTTCTGTCGAATGA C 3'(3109－3121)；

P3：5'AAGCTTTCAGGGGGAGCCGTTGACCGTCG 3'(8247－8269)；

P4：5' AAATACCGCCGACAGTACCAT 3'(4900－4920)；

P5：5' GAACGTCGAACGTGTTATGAC 3'(4997－5017)。

1.2.3 仪器 数字化凝胶成像分析仪、FTI－500 型、Pharmacia 公司；ABI PRISM™ 377XL DNA Sequencer

1.3 方法

1.3.1 从伤寒沙门菌 DNA 中调取 acrAB 全基因，并克隆至 pUC118 载体上(试剂盒均按操作说明进行)。

根据基因库序列设计一对引物 PCR 扩增全长 5Kb 基因，但变换各种条件均未成功，改用 P1/P5、P4/P3 引物分 2Kb、3Kb 两段 PCR 扩增获得全长约 5Kb 的基因，两段间重叠约 100 个碱基，以保证全长的真实性，并可酶切后进行连接，以便今后对全基因的功能进行克隆表达。

PCR 反应使用 TaKaRa Pyrobest™ DNA Polymerase 体系，DNA 提取采用上海生工 UNIQ－10 柱离心式多用途 DNA 抽提纯化试剂盒，反应条件为：50μl 反应体系、10 * pyrobest buffer 5.0μl、dNTP(各 2.5mmol/L)4μl、引物(10pmol)各 2μl、Pyrobest DNA Polymerase(5u/μl)0.25μl、DNA 模板 20ng；预变性 94℃ 5min，变性 94℃ 30s，退火 55℃ 30s，延伸 72℃ 5min，再延伸 72℃ 5min，共 30 个循环，5μl 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。使用 TaKaRa PCR Fragment Recovery Kit 回收 2kb、3kb 片段，溶于 20μl dH_2O。使用 TaKaRa BKL Kit 对回收产物进行 BK 处理及连接。载体使用 pUC118/HincⅡ/BAP(2kb 片段)、pMD18－TVECTOR(3kb 片段)。连接液全量热转化至 E. Coli Competent JM109 Cell 中。挑选菌落 2K－1,3,4,5,7,8 及 3K－12,14,15,16,17,19 以 LB 培养基增菌 E. Coli Competent JM109、回收提取质粒。1 μl 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。选 2K－1,3 及 3K－12,14 测序。

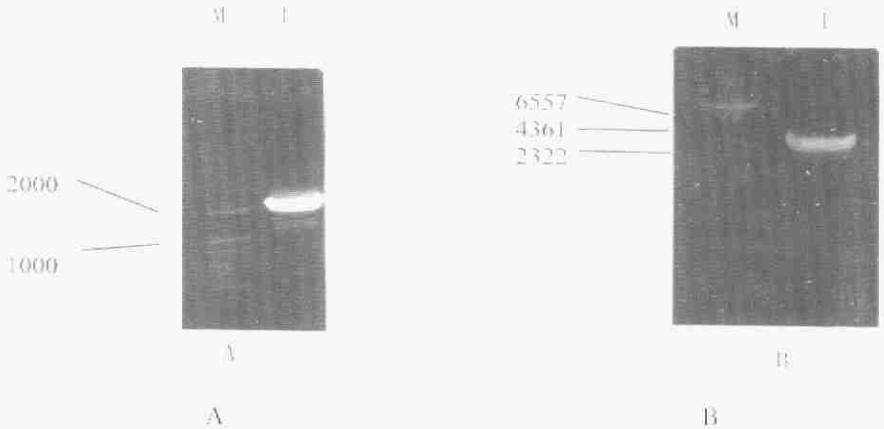
1.3.2 基因序列分析 委托宝生物工程(大连)有限公司对 PCR 产物测序。

2 结 果

2.1 伤寒沙门菌 275 acrAB 全基因的检测

分别以 P1/P5、P4/P3 为引物，PCR 扩增获得 2Kb、3Kb 片段 DNA，结果见图 1。

以 pUC118、pMD18－TVECTOR 为载体将该片段克隆至 E. Coli Competent JM109 中。挑选菌落 2K－1,3,4,5,7,8 及 3K－12,14,15,16,17,19 以 LB 培养基增菌 E. Coli Competent JM109、提取质粒。



A B

图 1A 伤寒沙门菌 acrAB 基因 2kb 片段 PCR 产物 M：DL－2000 Marker；1：2kb 片段

B 伤寒沙门菌 acrAB 基因 3kb 片段 PCR 产物 M：λ－*Hind* Ⅲ Marker；1：3kb 片段

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 2 伤寒沙门菌 acrAB 全序列比较

注:AL627267 为 Genebank 参照伤寒沙门菌序列,U00734 为 Genebank 参照大肠杆菌序列,S. typhi275 为伤寒沙门菌 275。本图所示序列 1 ~ 5161 对应伤寒沙门菌全基因基因库序列 3109 ~ 8269,* 表示碱基与伤寒沙门菌基因库参考序列相同,字体加粗者为起始密码,带方框者为终止密码,字体加粗且斜体者为 SD 序列,带着重号部分为启动区域,下画线处为引物所在位置。

2.1.3 选 2K - 1,3 及 3K - 12,14 质粒分别测序,结果 2kb 片段两质粒完全一致,但与参考序列有 13 点不一致,3kb 片段两质粒亦一致,但与参考序列有 19 点不一致,说明均为模板本身与参考序列不一致。

2.2 伤寒沙门菌 275acrAB 全基因序列分析

伤寒沙门菌 acrAB 全序列比较:如图 2。伤寒沙门菌 275 及参考伤寒沙门菌 acrAB 全序列共 5161 个碱基,其中 acrB(1 ~ 3150)共 3150 个碱基,反向编码 1049 个氨基酸,acrA(3173 ~ 4366)共 1194 个碱基,反向编码 397 个氨基酸,acrR(4508 ~ 5161)共 654 个碱基,正向编码 217 个氨基酸,acrA、acrB 间隔区(3151 ~ 3172),SD 序列(RBS)(3161 ~ 3165),acrA、acrR 启动区:(4367 ~ 4507),SD 序列(RBS)(4373 ~ 4377)。参考大肠杆菌 acrAB 全序列共 5155 个碱基,除 acrR(4508 ~ 5155)共 648 个碱基,其末端比伤寒沙门菌少 6 个碱基,正向编码 215 个氨基酸外,余均相同。

伤寒沙门菌 275 与 Genebank 报道伤寒沙门菌全基因中 acrAB 序列比较,共 32 处变异,同源性 99.38%,与大肠杆菌 acrAB 序列比较,共 789 处变异,同源性 84.71%。其中伤寒沙门菌 275 与 Genebank 伤寒沙门菌及大肠杆菌序列比较,acrB 分别有 20 处,462 处变异,acrA 分别有 8 处,199 处变异,acrR 分别有 2 处,119 处变异,acrA、acrB 间隔区及 acrA、acrR 启动区分别有 2 处,9 处变异

伤寒沙门菌 AcrAB 推定氨基酸序列

根据上述碱基序列,推测可能编码的氨基酸序如下,acrR:(4508 ~ 5161)正向编码氨基酸 217 个(参考大肠杆菌 215 个氨基酸);acrA:(3173 ~ 4366)

维普资讯 http://www.cqvip.com

反向编码氨基酸 397 个;acrB:(1 ~ 3150)反向编码氨基酸 1049 个 伤寒 275 acrR 部分,2 处碱基与伤寒沙门菌基因库不同,编码的氨基酸均与伤寒沙门菌基因库氨基酸相同。与参考大肠杆菌序列比较,共 119 处碱基变异,编码的氨基酸有 28 个与伤寒 275 不同。acrA 部分,伤寒沙门菌 275 共计有 8 处碱基与伤寒沙门菌基因库不同,编码的氨基酸有一个与伤寒沙门菌基因库不同(第 270 位氨基酸由 Ser→Thr)。与参考大肠杆菌序列比较,共 199 处碱基变异,编码的氨基酸有 33 个与伤寒沙门菌 275 不同。acrB 部分,伤寒 275 共计有 20 处碱基与伤寒沙门菌基因库不同,编码的氨基酸有一个与伤赛沙门菌基因库不同(第 964 位氨基酸由 Met→Thr)。与参考大肠杆菌序列比较,共 462 处碱基变异,编码的氨基酸有 56 个与伤寒沙门菌 275 不同。

3 讨 论

多重耐药系指对多种化学结构无关的抗菌药物同时耐药,其发生机制多与膜通透性及主动外排有关。AcrAB 主动外排泵最初在大肠杆菌中研究较为深入。国内外对伤寒沙门菌主动外排系统的研究除全基因测序发现有该基因外,尚无系统的深入研究。我们既往的研究表明[4],以敏感的伤寒沙门菌 275,用平板法筛选出的两代多重耐药菌 OM2、182,其对喹诺酮类耐药机理与其它革兰阴性菌相似,DNA 旋转酶变异为其基本耐药机制,外膜改变及主动外排为产生高水平耐药及其它药物交叉耐药的基础。而 OM2、182 所产生的主动外排增强的现象,究竟是 acrR 突变,系统调控基因 marR 突变,或者它们共同作用的结果,以及是否有其它全局性调节因子的参与,有待于更深入的研究。为此,我们首先测定了伤寒沙门菌 275 acrAB 基因的全序列,比较其同大肠杆菌相应基因结构与功能的异同。并为比较该基因同诱导多重耐药菌 OM2、182 相应基因是否存在突变及对该基因进行克隆表达作准备。

序列分析显示,同大肠杆菌一样,伤寒沙门菌 acrA、acrB 间无转录终止信号序列,同一个操纵子。AcrA 为 MFP 类,以一个复合体形式与 AcrB 共同存在[5],其前 24 个氨基酸为原核脂蛋白信号序列,N-端作为信号序列与成熟端分开,而 Cys25 对这种分隔是必须的,且是成熟 AcrA 的氨基酸 N-端[5,6]。AcrA 除 N-端信号肽外,没有跨膜片段,其第 49(Pro)-196(Gln)位氨基酸,第 371(Val)-374(Lys)位氨基酸,位于胞质间隙,其功能为辅助蛋白,起着桥梁作用连接 AcrB 与外膜通道蛋白 TolC。AcrB 为 RND 类,跨质膜 12 次,有约 12 个氨基酸的高度疏水区,含 2 个长片段的亲水区域,分别为氨基酸序列第 50 ~ 350 及 575 ~ 875,第 829 ~ 836 为 ATP/GTP 结合位点 P 环,含 8 个氨基酸,大肠杆菌、伤寒沙门菌及参考序列均相同 AcrB 没有信号肽,为一完整的膜蛋白[6,7]。在 acrAB 系统中,acrR 为局部阻遏物,它的突变往往导致 acrA 蛋白的过度表达,从而造成多重耐药。有报道分别在 AcrA 蛋白及 acrBmRNA 过量表达的大肠杆菌中,检测到 acrR 基因点突变导致的氨基酸替换[8~10]。

在研究中,伤寒沙门菌 275 acrR 未发现碱基缺失与重复,但末端多出第 216、217 两位氨基酸 Ser 与 Pro,其作用不详,推测该位点为伤寒沙门菌本身所特有,而非变异。acrA、acrB 是 AcrAB-TolC 系统的重要组成部分,它们的突变均导致该系统的失活,引起对吖啶黄、嗅乙啶、四环素、利福平等药物的高度敏感[6,11]。对伤寒沙门菌 275 的检测发现,acrA、acrB 各有一个位点的氨基酸与伤寒沙门菌参考序列不同,但与大肠杆菌相同,估计其变异对耐药没有影响。对诱导多重耐药菌 OM2、182 是否存在 acrR、acrA、acrB 的突变、碱基缺失或重复,我们将测定其全序列,并克隆表达,研究该主动外排耐药机理及调控机制,并作深入研究。

参 考 文 献

[1] 汪 复,朱德妹,张婴元. 上海部分医院细菌耐药性监测及其临床意义[J]. 中华传染病杂志,1996;14:149-151.

[2] 张 灵,刘陈滇,王宇倩,等. 多重耐药性伤寒杆菌的耐药机理研究[J]. 中华医学杂志,1991;71(6):314-317.

[3] Levy SB. Active efflux mechanisms for antibacterial resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1992;36(4):695-703.

[4] 肖永红,王其南,彭明利. 伤寒杆菌耐喹诺酮类机理研究[J]. 中国抗生素杂志,2000;25(6):462-466.

[5] Tetsuhiro K, Erika F, Akihito Y. Molecular Construction of a Multidrug Exporter System, AcrAB: Molecular Interaction between AcrA and AcrB, and Cleavage of the N-Terminal Signal Sequence of AcrA[J]. J. Biochem, 2000;128:195-200.

(下转第 714 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

MD－2 表达增强，内毒素通过与 TLR4/MD－2 的结合，启动 Kupffer 细胞激活的信号转导，引起 TNF－α 等细胞因子的分泌，最终造成对移植物的攻击和损害。但尚需进一步研究 TLR4/MD－2－NF－κB—细胞因子之间的信号转导过程，才能准确阐明 TLR4/MD－2 参与缺血再灌注损伤的整个信号转导通路。

（致谢：本研究是在重庆市肝胆外科重点实验室完成，在此感谢！）

参 考 文 献

[1] Nakaya TA, Kita M, Kuriyama H, et al. Panax ginseng Induces Production of Proinflammatory Cytokines via Toll－like Receptor[J]. J Interferon Cytokine Res, 2004; 24: 93－100.

[2] Kim L, Butcher BA, Denkers EY. Toxoplasma gondii interferes with lipopolysaccharide－induced mitogen－activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance[J]. J Immunol, 2004; 172: 3003－3010.

[3] Giakoustidis DE, Iliadis S, Tsanfilas D, et al. Blockade of Kupffer cells bygadolinium chloride reduces lipid peroxidation and protects liver from ischemia/reperfusion injury[J]. Hepatogastroenterology, 2003; 50: 1587－1592.

[4] PENG Y, GONG JP, YAN LN, et al. Improved two－cuff technique for orthotopic liver transplantation in rat[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2004; 3: 33－37.

[5] Gong JP, Wu CX, Liu CA, et al. Intestinal damage mediated by Kupffer cells in rats with endotoxemia[J]. World J Gastroenterol, 2002; 15: 923－927.

[6] Palliser D, Huang Q, Hacohen N, et al. A role for toil－like receptor 4 in dendritic cell activation and cytolytic CD8＋ T cell differentiation in response to a recombinant heat shock fusion protein[J]. J Immunol, 2004; 172: 2885－2888.

[7] Branger J, Leemans JC, Florquin S, et al. Toil－like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice [J]. Int Immunol, 2004; 16: 509－516.

[8] Yan SR, Qing G, Byers DM, et al. Role of MyD88 in Diminished Tumor Necrosis Factor Alpha Production by Newborn Mononuclear Cells in Response to Lipopolysaccharide[J]. Infect Immun, 2004; 72: 1223－1229.

[9] Mann PB, Kennett MJ, Harvill ET. Toil－Like Receptor 4 Is Critical to Innate Host Defense in a Murine Model of Bordetellosis[J]. J Infect Dis, 2004; 189: 833－836.

（上接第 710 页）

[6] Ma D, Cook DN, Alberti M, et al. Molecular cloning and characterization of acrA and acreE genes of Escherichia coli[J]. J. Bacteriol, 1993; 175: 6299－6313.

[7] Parkhill J., DouganG., James K, et al. Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi cT18[J]. Nature, 2001; 413(6858): 848－852.

[8] Ma D, Alberti M, Lynch C, et al. The local repressor AcrR plays amodulating role in the regulation of acrAB genes of Escherichia coli by global stress signals[J]. Mol Microbiol, 1996; 19(1): 101－112.

[9] Wang H, Joann L, DZink－Fox, et al. Genetic Characterization of Highly Fluoroquinolone－Reststant Clinical Escherichia coli Strains from China: Role of acrR Mutations[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001: 45(5): 1515－1521.

[10] Webber MA, PiddockL JV. Absence of Mutations in marRAB or soxRS in acrB－Overexpressing Fluoroquinolone－Resistant Clinical and Veterinary Isolates of Escherichia coli[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001; 45(5): 1550－1552.

[11] Ma D, Cook DN, Alberti M, et al. Genes acrAand acrB encode a Stress－induced efflux system of Escherichia coli[J]. Mol Microbiol, 1995; 16(1): 45－55.