DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.013
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)13-1149-04

论著

肺炎克雷伯菌 TEM-1 编码基因的克隆测序及基因定位

朱 卫民[1],陈勇 川[2],钱元恕[3],王宇明[1] (第三军医大学附属西南医院:[1]全军感染病研究所;[2]药剂科,重庆 400038;[3]汕头大学医学院药理学教研室,汕头 515031)

提 要:目的 以我院临床分离的一株肺炎克雷伯菌99-799株为研究对象,对其所产β-内酰胺酶编码基因的序列、亚型及基因定位进行研究。方法 采用聚合酶链反应(PCR),用β-内酰胺酶通用引物、bla_{TEM}扩增获得β-内酰胺酶编码基因的片段,克隆入pUCm-T载体,以双脱氧链终止法测定核苷酸序列,再通过GenBank进行同源性检测确定其亚型和基因所在位置。结果 肺炎克雷伯菌99-799株所含β-内酰胺酶基因型为TEM型,与TEM-1编码基因序列完全相同,且同时位于细菌150 bp和80 bp的大、小质粒上。结论 重庆地区临床分离肺炎克雷伯菌有TEM-1β-内酰胺酶基因亚型的存在。

关键词:β-内酰胺酶;聚合酶链反应;序列分析
中图法分类号:R378.99+6;R394-33;R394.3 文献标识码:A

Cloning, sequencing and positioning of the encoding gene of TEM-1 β-lactamase in *Klebsiela pneumoniae*

ZHU Wei-min, CHEN Yong-chuan, QIAN Yuan-shu, WANG Yu-ming (Research Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To analyse the encoding gene of β-lactamase of the clinically isolated *Klebsiela pneumoniae* 99-799 and to identify its subtype. Methods The gene of β-lactamase derived from a stain of *Klebsiela pneumoniae* 99-799 named as was amplified by PCR. The purified PCR product was cloned into pUCm-T vector and sequenced by Sanger's dideoxy chain termination composition method. Results The encoded gene of the bacterium was identified as TEM by PCR. It had the same sequence as the gene encoding TEM-1 and positioned at the 150 bp and 80 bp plasmids. Conclusion The TEM-1 β-lactamase exists in Chongqing area.

Key words: β-lactamase; polymerase chain reaction; sequence analysis

细菌对抗菌药物的耐药性已成为全球关注的问题。临床上革兰阴性细菌对β-内酰胺类抗生素耐药的主要机制是细菌产生多种可迅速水解这些抗生素的广谱和超广谱β-内酰胺酶。鉴于近年来肺炎克雷伯菌已成为临床最常见的革兰阴性致病菌之一,并是院内感染的主要致病菌,因此对其所产β-内酰胺酶进行研究具有重要的理论和实践意义。本研究选择一株对多种β-内酰胺类抗生素耐药的肺炎克雷伯菌,对其产酶基因进行克隆、测序及基因定位,为从分子水平开展院内肺炎克雷伯菌耐药株感染的控制和监测,指导临床合理使用抗菌药物提供科学依据。

作者简介:朱卫民(1968-),女,四川省南充市人,博士,主治医师,主要从事抗生素临床药理和细菌耐药机制方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754475-8006

收稿日期:2002-08-22;修回日期:2002-12-23

1 材料与方法

1.1 菌株

1.1.1 临床分离菌株 肺炎克雷伯菌99-799株是我院1999年于一名严重肺部感染患者痰培养中分离所得。

1.1.2 质控菌株 大肠埃希菌ATCC25922、铜绿假单胞菌ATCC27853(重庆市临床检验中心提供)。

1.2 药品与试剂

1.2.1 药品 氨苄西林(AMP);头孢曲松(CRO);头孢噻肟(CTX);头孢呋辛(CXM,);头孢他定(CAZ);头孢西丁(FOX);亚胺培南(IMP);氨曲南(ATM);阿莫西林/克拉维酸(AMC);氨苄西林/舒巴坦(SAM);环丙沙星(CIP);庆大霉素(GEN)。

1.2.2 试剂 DNA Markers、PCR Markers(华美生物工程公司);Tris-HCl、EB、琼脂糖、基因组小量DNA抽提试剂盒、Taq酶、dNTP及反应缓冲体系、限制性内切酶 *Hind* Ⅲ、*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ、UNIQ-柱式PCR产物回收试剂盒、PCR产物克隆试剂

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

盒、X-Gal、IPTG 均购自上海 Sangon 生物工程技术有限公司；PhastGel 及蛋白质等电点 3-10 标准(Pharmacia 公司)。

1.3 引物合成

1.3.1 β-内酰胺酶通用引物[1] 正链：5′-TGGGTGCACGAGTGGGTTAC-3′，负链：5′-TTATCCGCCTCCCCATCCACTC-3′；

1.3.2 bla_{TEM} 基因引物[2] 正链：5′-AGATCAGTTGGGTGCACGAG-3′，负链：5′-TGCTTAATCAGTGAGGCACC-3′；

以上引物均由上海 Sangon 合成。

1.4 细菌药敏

用多点接种仪以琼脂稀释法检测多种抗生素对临床分离肺炎克雷伯菌的MIC，选择对多种β-内酰胺类抗生素耐药的菌株。细菌耐药浓度临界判断参照 2000 年NCCLS 标准。

1.5 分析性等电聚焦

β-内酰胺酶粗提液的制备及定性检测参照文献[3] 方法进行。在 Pharmacia LKB Phast System 等电聚焦仪上按仪器说明书设置电泳参数，用浸有 Nitrocefin 的滤纸进行染色，等电点标准按标准考马斯亮蓝蛋白染色法进行。

1.6 PCR 扩增

采用碱裂解法提取质粒 DNA[4]，PCR 反应体积为 100 μl，含 10× PCR 反应缓冲液 10 μl，10 mmol/L 的 dNTP 2 μl，25 mmol/L 的 $MgCl_2$ 6 μl，模板(质粒 DNA)2 μl，上、下游引物各 4 μl，5 U/μl 的 Taq 酶 1 μl，H_2O 72 μl。β-内酰胺酶通用引物扩增反应：94 ℃ 1 min，55 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，共循环 30 次，最后 72 ℃延伸 10 min。bla_{TEM} 基因扩增反应：94 ℃ 1 min，50 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，共循环30次，最后 72 ℃延伸 10 min。

1.7 PCR 产物的纯化、克隆

PCR 扩增产物经 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳，切下目的带，用PCR 产物纯化试剂盒纯化目的 DNA，取 4 μl 与含氨苄西林抗性基因的 pUCm-T Vector 连接，连接反应液转化至经氯化钙制备的大肠埃希菌 $DH_{5\alpha}$ 感受态细胞，经含氨苄西林(60 μg/ml)的 LB 培养基进行蓝白斑筛选，挑取白色菌落，接种于含氨苄西林的 LB 培养液中，37 ℃培养过夜，碱裂解法提取质粒，经 *Eco*RⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切鉴定。

1.8 核苷酸序列测定及分析

以重组细菌质粒为模板，以 PUCm-T Vector 所含 M13 通用引物按Sanger 双脱氧末端终止法，采用 ALF 自动测序仪进行双向测序。测序结果在 GenBank 网上查询。

1.9 TEM 型编码基因的定位

肺炎克雷伯菌 99-799 株质粒电泳后，回收不同的质粒 DNA 片段再分别以它们为模板，以 bla_{TEM} 引物进行 PCR 扩增(反应体系及参数同前)，对 TEM 型编码基因进行定位。

2 结果

2.1 药敏结果

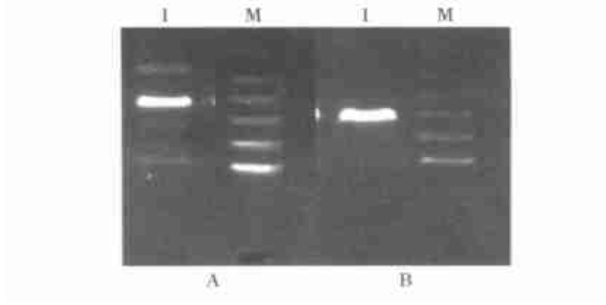
肺炎克雷伯菌 99-799 药敏结果显示，该菌对头孢曲松、头孢噻肟、头孢呋辛、氨曲南、氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦高度耐药，MIC＞ 128 μg/ml，对阿莫西林/克拉维酸也耐药，MIC 为 32 μg/ml；对头孢他啶中度敏感，MIC 为 16 μg/ml；对头孢西丁、亚胺培南敏感，其 MIC 分别为 8、0.25 μg/ml。此外，该菌对环丙沙星和庆大霉素也高度耐药，其 MIC 分别为 32 μg/ml 和＞ 128 μg/ml。

2.2 肺炎克雷伯菌 99-799 分析性等电聚焦

肺炎克雷伯菌 99-799 可见 3 条红色条带，其等电点(pI)值分别约为 5.4、7.8 和 9.0，说明此菌至少产 3 种β-内酰胺酶，见图 1。

2.3 PCR 扩增和基因克隆结果

以肺炎克雷伯菌 99-799 株的质粒 DNA 为模板，用β-内酰胺酶通用引物和 bla_{TEM} 引物进行 PCR 扩增，扩增结果均为阳性，其中通用引物片段大小约为 480 bp，TEM 片段大小约为 750 bp，说明此菌质粒上存在 TEM 型酶的编码基因，见图 1。



A：PCR products of the common primers for β-lactamase；B：PCR products of the TEM primers；1：PCR products；M：-DNA marker(1 543，994，697，515，377，237 bp)

图 1 肺炎克雷伯菌 99-799 质粒β-内酰胺酶编码基因 PCR 产物电泳分析

Fig 1 Electrophoretic analysis of β-lactamase genes on plasmid in *K. pneumoniae* 99-799

2.4 重组质粒的构建及酶切鉴定结果

将TEM 酶 PCR 扩增产物分别连接至 PUC_m-T 载体后转入大肠埃希菌 $DH_{5\alpha}$ 感受态细胞中，重组质粒经 *Eco*RⅠ 和 *Hind*Ⅲ双酶切，电泳证实酶切后产生的片段大小为 890 bp，除去酶切点两端载体片段，其大小与 PCR 产物 750 bp 一致，证明肺炎克雷伯菌 99-799 株的TEMPCR 产物已成功克隆入载体中。

2.5 测序结果

重组质粒经自动测序仪进行序列分析，TEM 酶测得 679 bp。经 GenBank 同源性比较，发现 TEM 与 TEM-1(注册号 AF126482)的核苷酸序列同源性为 100%，见图 2。

2.6 bla_{TEM} 基因定位

肺炎克雷伯菌 99-799 质粒 DNA 电泳显示共有大、中、小 3 个质粒片段，其大小分别约为 150、80、30 bp。分别以不同质粒为模板，以 bla_{TEM} 为引物进行 PCR 扩增，结果 150、30 bp 的大、小质粒均扩增到阳性片段，大小约为 750 bp，说明 bla_{TEM} 编码基因同时位于 150 bp 和 30 bp 的两个质粒上。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

```
Query: 3     tcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttc 62
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1223  tcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttc 1282
Query: 63    caatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggtgcggtattatcccgtgttgacgccg 122
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1283  caatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggtgcggtattatcccgtgttgacgccg 1342
Query: 123   ggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcac 182
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1343  ggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcac 1402
Query: 183   cagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccca 242
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1403  cagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccca 1462
Query: 243   taaccatgagtgataacactgctgccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaagg 302
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1463  taaccatgagtgataacactgctgccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaagg 1522
Query: 303   agctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaac 362
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1523  agctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaac 1582
Query: 363   cggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatgg 422
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1583  cggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatgg 1642
Query: 423   caacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaat 482
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1643  caacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaat 1702
Query: 483   taatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccgg 542
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1703  taatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccgg 1762
Query: 543   ctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattg 602
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1763  ctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattg 1822
Query: 603   cagcactgggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacgggggagtc 662
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 1823  cagcactgggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacgggggagtc 1882
Query: 663   aggcaactatggatgaa 679
             ||||||||||||||||
Sbjct: 1883  aggcaactatggatgaa 1899
```

图 **2**　肺炎克雷伯菌 **99-799** 株 **TEM** 基因同源性分析

Fig 2　Homogenous analysis of TEM gene sequence from *K. pneumoniae* 99-799　Query: bla_{TEM} gene of *K. pneumoniae* 99-799; Sbjct: bla_{TEM-1} gene

3　讨论

青霉素和头孢菌素等β-内酰胺类抗生素对人类抵抗细菌感染做出了巨大贡献。但是随着其广泛大量使用, 细菌耐药性逐年上升。革兰阴性细菌对β-内酰胺类抗生素的耐药机制有多种, 但以产生β-内酰胺酶为最重要和最常见。

肺炎克雷伯菌广泛存在于自然界、医院及人体皮肤上, 是目前临床最常见的革兰阴性致病菌之一, 也是最常见的产β-内酰胺酶菌株, 主要产 TEM 和 SHV 型β-内酰胺酶, 常对多种β-内酰胺类抗生素甚至β-内酰胺酶抑制剂耐药。近年已有较多有关肺炎克雷伯菌引起院内感染暴发的报道[5], 除传统的感染暴发模式外, 感染暴发中分离到的肺炎克雷伯菌存在多样性及复杂性, 即同一菌株可携带多种质粒, 从同一患者可同时分离到多种不同基因型的产 ESBLs 菌株[6]。

本研究以一株耐多种β-内酰胺类抗生素的肺炎克雷伯菌为研究对象, 对其所产的 TEM 型β-内酰胺酶分子遗传学特性进行了研究。通过药敏实验, 分析性等电聚焦, 发现该菌产 3 种 pI 值分别为 5.4、7.8 和 9.0 的β-内酰胺酶, 且经 bla_{TEM} 基因引物进行 PCR 扩增, 证实存在 TEM 型β-内酰胺酶的编码基因; 进一步将 PCR 产物经纯化、克隆、酶切、测序, 经 GenBank 同源性检测, 证实此菌株所产 TEM 型酶为 TEM-1(同源性 100%)。结合该菌对第三代头孢菌素和氨曲南包括在内的β-内酰胺抗生素高度耐药, 且不能被β-内酰胺酶抑制剂舒巴坦和克拉维酸抑制的药敏结果, 推测此肺炎克雷伯菌株不仅携带多种耐药质粒, 而且这些质粒上还存在其它超广谱β-内酰胺酶、AmpC 酶以及钝化酶等的耐药基因。此外, 本研究还发现 TEM 的编码基因可以同时存在于肺炎克雷伯菌的不同质粒上, 国外也有类似报道[2]。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

TEM-1 虽然只是广谱酶,绝大多数头孢菌素对之稳定,但随着抗生素的大量应用,可诱导 TEM-1 编码基因不同位点氨基酸的突变,产生大量的超广谱β-内酰胺酶(ESBLs),导致对多种头孢菌素包括氨曲南在内的抗生素耐药,给临床治疗带来极大困难。

新β-内酰胺酶的不断出现表明致病菌正以惊人的速度发展其耐药机制,有效治疗产新β-内酰胺酶的细菌所致感染是人类 21 世纪面临的一大难题。合理使用抗生素,尤其是第三代头孢菌素,是减少 ESBLs 和高产 AmpC 酶突变株引发耐药的关键。我们期待着有更多地对 ESBLs 和 AmpC 酶稳定的新β-内酰胺类抗生素、酶抑制剂及β-内酰胺酶抑制蛋白的出现。

参考文献:

[1] 束学安, 罗文侗, 修清玉, 等. 耐氨苄西林流感嗜血杆菌产β-内酰胺酶机制研究[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(10): 770-772.
[2] Hanson N D, Thomson K S, Moland E S, *et al*. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC[J]. J Antimicrob Chemother, 1999, 44(3): 377-380.
[3] 朱卫民, 钱元恕. TEM 型β-内酰胺酶动力学研究[J]. 中国抗生素杂志, 2001, 26(6): 460-463.
[4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning[M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 19.
[5] Winkur P L, Canton R, Casellas J M, *et al*. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the American, and the Western Pacific region[J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(Suppl 2): S94-103.
[6] Essack S Y, Hall L M, Pillay D G, *et al*. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(1): 88-89.

(编辑 刘洪娥)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)13-1152-01

快速深静脉置管术在创伤休克急救中的应用

Applications of rapid deep venous intubation during traumatic shock

孙 [illegible], 文 亮, 闫柏刚 (第三军医大学附属西南医院急救部, 重庆 400038)

我科自 2001-12-2002-12 在创伤病人急救中采用深静脉置管术 372 例,大大地缩短了建立有效循环的时间,为急救病人特别是创伤病人抗休克、输血、测定中心静脉压、用药、手术准备提供了有效的保障,提高了急救的质量和水平。

1 资料与方法

1.1 材料

配套穿刺置管器选用美国 Arrow 公司的单腔、双腔、三腔深静脉导管 8Fr 等型号。

1.2 临床资料

372 例病人中男 251 例,女 121 例;年龄 6~82 岁,平均 36.3 岁;病种为颅脑损伤硬脑膜下、外血肿 97 例;四肢长骨骨折 83 例;肝、脾、肾破裂 61 例;心脏刀刺伤 7 例;血气胸 56 例;急性脑出血 37 例;急性心肌梗死 2 例,其它 29 例。其中严重多发伤 124 例,失血性休克 224 例,均在急诊抢救的情况下进行深静脉置管术,同时建立外周静脉通道。

1.3 方法

穿刺技术为常规中心静脉置管术,穿刺路径为经皮进入左右颈内静脉、锁骨上、下静脉、股静脉。患者取合适的体位(颈内静脉穿刺取去枕平卧、头低 20°~30°;锁骨上、下静脉穿刺取头低肩高位或平卧位;股静脉穿刺取平卧位,穿刺侧下肢外展并外旋),常规消毒铺巾,最好用 1%的利多卡因在进针点做局部浸润麻醉,用抽有肝素稀释液的空针连接深静脉穿刺针,进针角度采用 30°~40°,针尖进入皮下,使空针保持负压,缓慢进针,边进针边回抽,至 3~4 cm 可抽到回血,从针腔内缓缓插入引导钢丝 10~15 cm 后退出穿刺针,将扩张器尖端套在钢丝上顺着钢丝慢慢插入,并轻轻旋转 2~3 次退出,然后用静脉导管尖端套在引导钢丝外面,轻轻插入静脉,同时左手拿住从静脉导管末端退出的引导钢丝不放,至静脉导管全部插入静脉后,退出钢丝,回抽血液通畅,连接输液器,用导管夹固定或缝合固定于皮肤上,覆盖透明敷料膜[1]。

2 结果

颈内静脉置管 211 例,股静脉置管 96 例,锁骨上、下静脉置管 65 例,留置时间 1~45 d。372 例病人共穿刺 406 次,一次穿刺成功率 91%,穿刺时间(含作局麻等准备时间)为 4~9 min。误穿动脉 13 例,误穿入胸腔 1 例,局部出现血肿 9 例,疑有感染后拔出导管 5 例。

3 讨论

我科采用快速置管方法应用于抢救创伤休克中,受到较好

(下转 1156 页)

作者简介: 孙 [illegible](1965-),女,重庆市人,主管护师,主要从事急救护理、护理管理、创伤后心理障碍方面的研究。电话: (023)65343528

收稿日期: 2003-03-13; 修回日期: 2003-05-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net