

研究报告

粘质沙雷氏菌氯霉素抗性基因的克隆及其性质分析

季秀玲, 林连兵, 井申荣, 魏云林

昆明理工大学生物工程技术研究中心, 昆明 650224

摘要: 通过构建粘质沙雷氏菌 KMR-3 菌株的基因组 DNA 文库, 克隆到了与该菌的氯霉素抗性相关基因, 并对其部分特性进行了初步研究。结果表明: 克隆到的氯霉素抗性基因所编码的蛋白属于 PRK10473 蛋白, 由 397 个氨基酸编码, 与变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans* 568) Bcr/CflA 亚家族药物抗性转运蛋白同源性最高, 达到 92%, 并对该基因的调控序列(启动子、终止子、SD 序列及转录起始位点)进行了分析。

关键词: 粘质沙雷氏菌, 抗性基因, 克隆

Cloning and Characterization of the Chloramphenicol Resistant Gene of *Serratia marcescens* Strain KMR-3

Xiuling Ji, Lianbing Lin, Shenrong Jing, and Yunlin Wei

Biotechnology Research Center of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China

Abstract: Chloramphenicol-resistant gene was cloned and analyzed by constructing genomic DNA library of *Serratia marcescens* KMR-3. It showed that cloned chloramphenicol-resistant gene encoded a protein product of 397 amino acids. The protein belonged to PRK10473 protein, and it showed 92% similarity to drug resistance transporter, Bcr/CflA subfamily of *Serratia proteamaculans* 568. Regulation elements including promoter, terminator, Shine-Dalgarno (SD) sequence and transcription start site also were identified.

Keywords: *Serratia marcescens*, resistant gene, cloning

沙雷氏菌属在自然界分布很广, 一般存在于土壤、水、植物、动物以及人类的肠道和呼吸道中。粘质沙雷氏菌, 又称灵杆菌, 是引起医院内感染的重要条件致病菌, 引起泌尿系、呼吸道感染, 还可污染烧伤创面引起脓毒症而死亡。近年来在医院感染中已成为极重要的细菌, 其对抗生素的耐药程度超过铜绿假单胞杆菌、普鲁菲登斯菌和变形杆菌。氯霉素具广谱抗微生物作用, 包括需氧革兰阴性菌及革兰阳性菌、厌氧菌、立克次氏体、螺旋体和衣

原体。氯霉素为脂溶性, 作用机制为通过弥散进入细菌细胞内, 并可逆性地结合在细菌核糖体的 50S 亚基上, 使肽链增长受阻(可能由于抑制了抑制肽酰基转移酶的作用), 因此抑制肽链的形成, 从而阻止蛋白质的合成。细菌对氯霉素产生耐药性比较慢, 可能是通过基因的逐步突变而产生的, 但可自动消失。细菌也可以通过 R 因子的转移而获得耐药性, 获得 R 因子的细菌能产生氯霉素乙酰转移酶使氯霉素灭活。

Received: January 4, 2008; **Accepted:** March 12, 2008

Supported by: the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry.

Corresponding author: Yunlin Wei. Tel: +86-871-3801018-205; Fax: +86-871-3801191; E-mail: weiyunlin@yahoo.com.cn

教育部留学回国人员科研启动基金资助。

本文利用从昆明冶炼厂周围废水中分离到的一株对多种重金属离子和氯霉素均具有高抗性的粘质沙雷氏菌, 通过在大肠杆菌中构建该菌的基因组 DNA 文库, 筛选到与氯霉素抗性相关的基因, 并对该基因的部分特性进行了研究。对粘质沙雷氏菌抗生素抗性基因的研究, 将会为医院内防治沙雷氏菌的感染提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

粘质沙雷氏菌 KMR-3 (*Serratia marcescens* KMR-3)菌株^[1], 由本实验室分离, 分离自昆明冶炼厂周围的废水(pH 5.0)。

pUC118BamH I/BAP 和 pMD18-T vector 为 TaKaRa 产品。

E. coli DH5 α 感受态细胞, 本实验室自制, 转化效率为 5×10^8 转化子/ μg DNA。

1.1.2 培养基

(1) 普通培养基: LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 10, pH 7.0。

LB 固体培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 10, 琼脂 20, pH 7.0。

(2) 选择性培养基: 在 LB 培养基中补加终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素和终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素。

1.1.3 试剂及药品

药品均为分析纯。

限制性内切酶, 购自 TaKaRa 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因文库的构建

(1) 粘质沙雷氏菌 KMR-3 菌株染色体 DNA 的提取及定量: 基因组总 DNA 的提取按参考文献[2]进行。

通过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测抽提的染色体 DNA, 紫外分光光度计定量基因组 DNA 的浓度。

(2) *Sau3A* I 部分酶切 KMR-3 菌株基因组 DNA^[3]: 酶切基因组 DNA 体系为 20 μL : 基因组 DNA 27.5 μg , *Sau3A* I 0.125 u, $10 \times \text{H}$ buffer 2 μL , 加无菌水补足至 20 μL , 37°C 酶切 50 min, 进行琼脂糖凝胶电泳。

(3) 连接 pUC118BamH I/BAP: 胶回收酶切产物, 并与 pUC118BamH I/BAP 连接。连接体系为 20 μL : pUC118BamH I/BAP 50 ng, 胶回收酶切产物 1 μg , T₄ DNA 连接酶 1 μL , $10 \times \text{T4}$ DNA buffer 2 μL , 加无菌水补足至 20 μL , 16°C 连接 10 h。

(4) 电转化 *E. coli* DH5 α : 连接产物经乙醇沉淀, 电转化 *E. coli* DH5 α , 乙醇沉淀后的连接产物与 90 μL *E. coli* DH5 α 感受态细胞(转化效率为 5×10^8 转化子/ μg DNA)均匀混和, 利用电转仪(Bio-Rad)进行电转化: 电压 1.8 kV, 电极杯 1 mm, 电容 25 μF , 电阻 200 Ω , 然后加入 900 μL 冰冷的 LB 液体培养基, 37°C 温育 30 min, 涂布 6 个终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 平板, 37°C 培养 12 h。

1.2.2 抗性基因的筛选

(1) 抗性克隆的筛选: 取保存的文库菌 10 μL , 用无菌水稀释 10 倍, 涂布终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 选择性平板, 同时涂布新鲜培养的含有 pUC118 质粒的 *E. coli* DH5 α 菌 20 μL 于同样的选择性平板, 作为对照, 37°C 培养 48 h。

(2) 抗性克隆质粒抽提及酶切鉴定: 从选择性平板上任意提取 3 个单克隆, 于终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 液体培养基, 37°C 培养 36 h 后抽提质粒, 具体方法参见文献[1]。

酶切体系为 20 μL : 限制性内切酶 0.2 μL , 质粒 300 ng, $10 \times \text{buffer}$ 2 μL , 加无菌水补足至 20 μL , 37°C 酶切 10 h。其中所用限制性内切酶分别为: *Hinc* II、*Hind* III、*Bgl* II、*Eco* RI、*Sal* I、*Sma* I、*Bam* HI、*Pst* I。

根据限制性内切酶酶切结果, 选择只有一个酶切位点的酶, 通过双酶切检测插入片段的大小: *Eco* RI 和 *Sal* I 各 0.2 μL , 质粒 300 ng, $10 \times \text{H}$ buffer 1 μL , 加无菌水补足至 10 μL , 37°C 酶切 10 h。通过琼脂糖凝胶(1%)电泳检测插入片段的大小。

(3) PCR 扩增进行鉴定、序列测定及同源性分析: 以 M₁₃(RV/M₄)为引物, 通过菌落 PCR 扩增检测转化产物, 引物序列如下: M₁₃(M₄): 5'-GTTTCCAGT CACGACGTTGTAAA-3', M₁₃(RV): 5'-ATTCACA CAGGAAACAGCTATGAC-3'。由北京华大中生科技发展有限公司合成, PCR 扩增反应体系(50 μL)组成如下: $10 \times \text{PCR}$ buffer 5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 3 μL ,

模板 10 ng, 引物各 50 pmol, *Taq* DNA 聚合酶 1 u。PCR 扩增程序: 94°C 变性 45 s, 55°C 退火 45 s, 72°C 延伸 90 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。

PCR 产物的测序由北京三博远志公司完成。将所测序列通过 DNASTar 软件进行分析, 寻找可能的 ORF, 最后利用 Blast (Ver2.2.17) 进行序列同源性检索分析。

1.2.3 抗性基因验证

(1) CaCl_2 法感受态细胞的制备参见文献[2]

(2) 酶切及 PCR 验证: 对 CaCl_2 法转化 *E. coli* DH5 α 后生长的菌落在 LB 液体培养基中进行培养, 用博大泰克试剂盒抽提质粒, 并进行酶切(*EcoR* I-*Sal* I) 及 PCR 扩增。

1.2.4 抗性基因特性研究

(1) 氯霉素抗性基因测序及寻找 ORF: 氯霉素抗性基因经三博远志公司测序后, 利用 DNASTar 软件中的 EditSeq 找到 ORF。

(2) 氯霉素抗性蛋白定位的预测: 通过蛋白定位预测软件(<http://psort.nibb.ac.jp/>)预测粘质沙雷氏菌氯霉素抗性蛋白的定位。

(3) 氯霉素抗性蛋白保守区域: 找到氯霉素抗性蛋白的 ORF 后, 通过 NCBI 中的 Blastp (Ver2.2.17) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blastp>) 进行检索, 找到该蛋白的保守区域。

(4) 蛋白同源性比对: 利用 Blast (Ver2.2.17) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行序列同源性检索分析。

(5) 氯霉素抗性蛋白跨膜结构的预测: 利用 DAS Transmembrane Prediction 软件进行蛋白跨膜结构的预测。

(6) 氯霉素抗性基因调控序列分析: 找到粘质沙雷氏菌氯霉素抗性蛋白的 ORF 后, 利用相关软件分析 ORF 上、下游的调控序列。如: 启动子预测软件 Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 及终止子预测软件 Sofeberry FindTem (<http://sun1.softberry.com/berry.phtml>), 并利用 Eponine Transcription Start Site Finder (<http://servlet.sanger.ac.uk:8080/eponine>) 预测其转录起始位点及 SD 序列。然后利用 DNASTar 软件 MegAlign 中的 Clustal 方法进行多个序列的比对。

2 结果与分析

2.1 KMR-3 菌株基因文库的构建

本实验所获基因组 DNA 浓度为 11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。*Sau*3A I 部分酶切基因组 DNA, 0.125 u 酶切 50 min 效果最好, 胶回收 0.5~4 kb 的目的区域, 并与 pUC118*Bam*H I/BAP 连接, 电转化 *E. coli* DH5 α , 然后进行平板菌落计数: 平均每个平板单菌落为 4000 个, 共计 24000 个单克隆。目的片段大小约为 2000 bp, 细菌基因组大小约为 10^6 bp, 据文库覆盖率公式计算该基因组 DNA 文库的覆盖率达到 99.9%, 为有效文库。

2.2 抗性基因的筛选

在终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 选择性平板上成功筛选到目的克隆, 并抽提质粒。通过限制性内切酶进行酶切及 PCR 扩增检测插入片段的大小。酶切及 PCR 扩增结果见图 1 和图 2。

从双酶切结果可以看出: 氯霉素抗性基因插入片段的大小约为 1.8 kb, PCR 扩增进一步验证了双酶切结果。因此, 将质粒送去测序, 由三博远志公司完成。

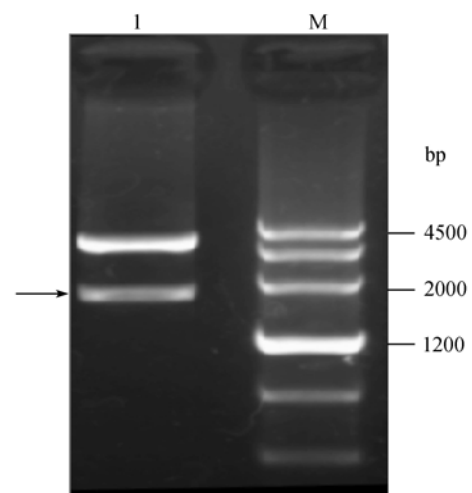


图 1 氯霉素抗性基因双酶切电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of chloramphenicol resistance gene by digesting with *EcoR* I and *Sal* I

M: DNA marker III; I: Plasmid digested by *EcoR* I and *Sal* I

2.3 氯霉素抗性基因特性研究

2.3.1 氯霉素抗性基因系列及 ORF 的确定

氯霉素抗性基因测出序列全长为 1765 bp, 通过 DNASTar 分析, 找到 ORF(397 aa), 预测的分子量约

为 41383.8 D, 理论 pI 值为 8.99。

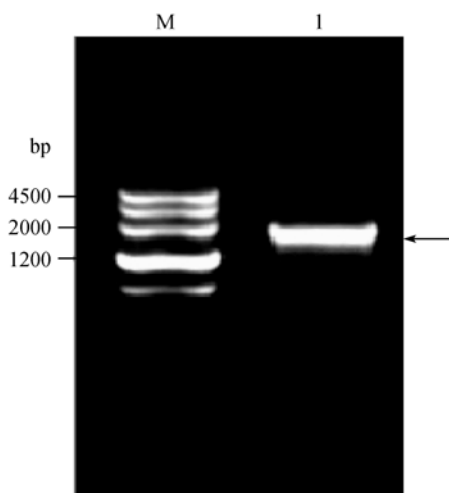


图 2 氯霉素抗性基因 PCR 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of chloramphenicol resistance gene by PCR amplification

M: DNA marker III; 1: PCR product

2.3.2 蛋白定位分析

找到 ORF 序列后, 利用软件进行蛋白定位的分析。通过软件分析发现, 该氯霉素抗性蛋白在细胞胞质、质膜、周质、外膜和胞外中的分布情况非常明显, 完全分布在质膜。因此, 该蛋白最终定位于细胞质膜, 这与相关文献报道的一致^[4]。

2.3.3 推断的保守区域

找到氯霉素抗性蛋白的 ORF 后, 利用 Blast (Ver.2.2.17)进行序列同源性检索分析, 找到推断的保守区域。本实验中克隆到了粘质沙雷氏菌的氯霉素抗性基因, 其所编码的蛋白为 PRK10473 蛋白。

2.3.4 蛋白同源性比对

找到氯霉素抗性蛋白的 ORF 后, 利用 Blast (Ver.2.2.17)进行序列同源性比对, 表明其与变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans* 568) Bcr/CflA 亚家族药物抗性转运蛋白同源性最高, 达到 92%, 与小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081)推断的多药抗性蛋白的同源性达到 79%。

2.3.5 粘质沙雷氏菌抗铜基因分析

利用 DNASTar 软件找到克隆到的氯霉素抗性基因的 ORF 后, 通过软件预测 ORF 上、下游的调控序列, 如: 预测启动子区域、终止子及 SD 序列(图 3)。ATG 为起始密码子, 编码甲硫氨酸, TGA 为终止密

码子, 该氯霉素抗性蛋白由 398 个氨基酸编码。预测的启动子区域为: 5'-GGCTTTAACCCGAAAAAGG CCGCCCGTTTCGAAGGTATGCCGCATCGGGC-3', SD 序列为 GGACG。T 为转录起始位点, TACTCT 为 -10 区, TTTTCA 为 -35 区。预测软件及人工分析均未发现终止子区域。

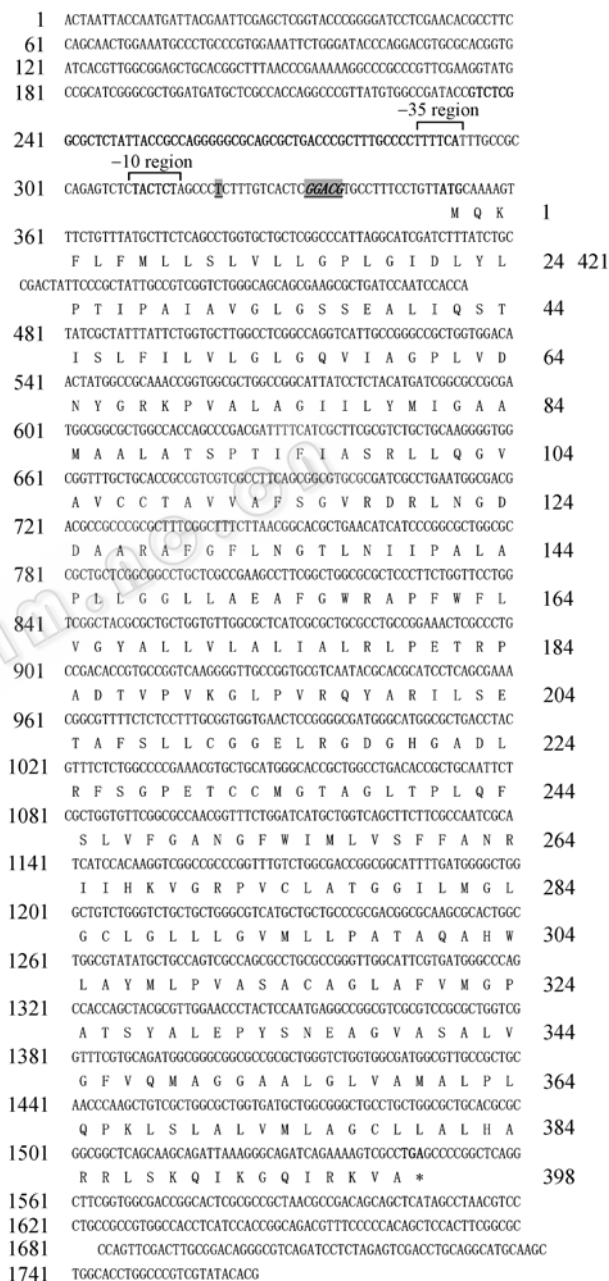


图 3 氯霉素抗性基因序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of the chloramphenicol resistance gene and deduced amino acid sequence

The potential promoter sequence and the putative Shine-Dalgarno sequence are boldfaced and underlined, respectively. The nucleotides are numbered on the left, and the deduced amino acid sequences are numbered on the right

利用 DNASar 软件, 将获得的粘质沙雷氏菌氯霉素抗性蛋白与 NCBI 中 Blast 比对同源性最高的两株菌 *Serratia proteamaculans* 568 和小肠结肠

炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081) 的蛋白进行比对, 并构建蛋白比对图(图 4)。

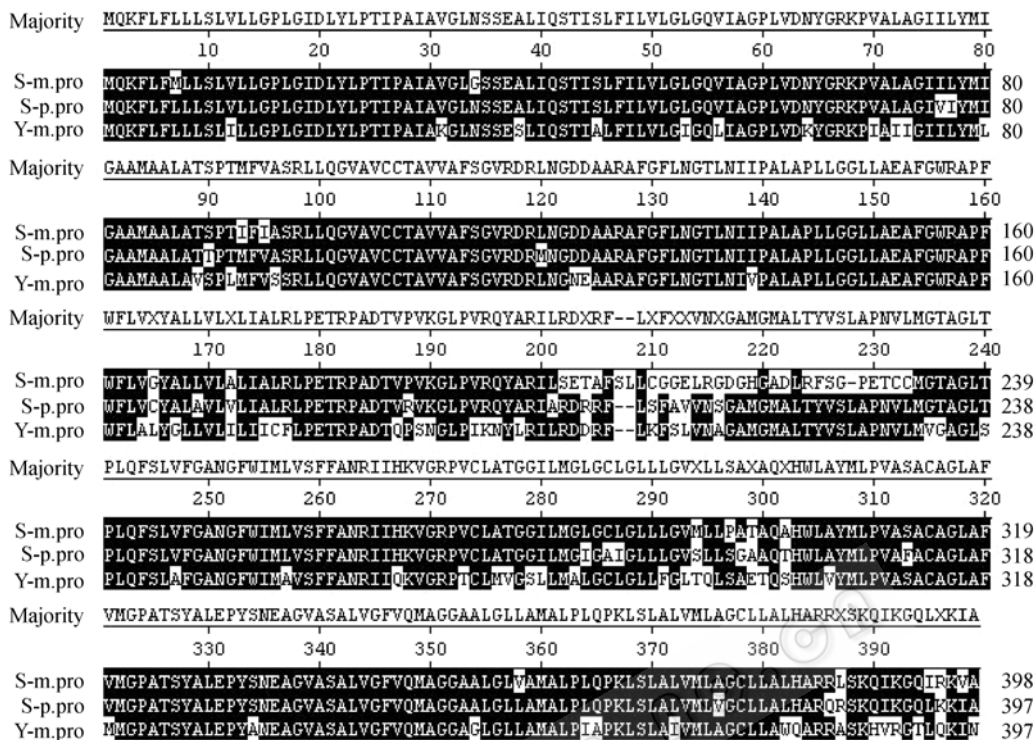


图 4 氯霉素抗性蛋白序列比对图

Fig. 4 Sequence alignment of chloramphenicol resistance gene and PRK10473 from *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 and *Serratia proteamaculans* 568

2.3.6 蛋白跨膜结构预测

将 ORF 序列提交到相应软件(DAS transmembrane prediction)进行蛋白跨膜结构的预测。根据预测结果, 可以看到, 该氯霉素抗性蛋白具有 10 个跨膜区域(图 5)。

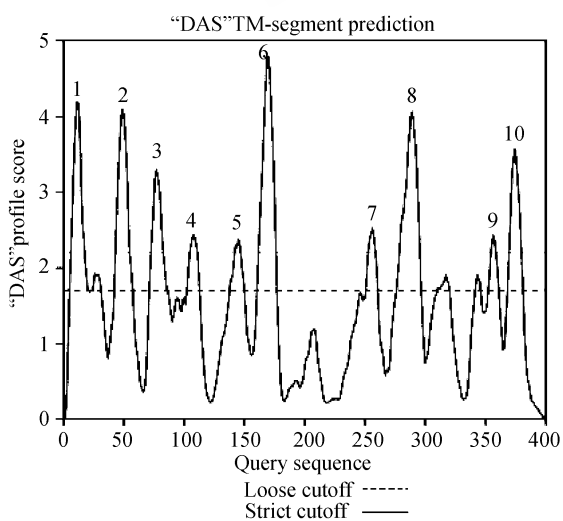


图 5 氯霉素抗性蛋白跨膜区域

Fig. 5 Transmembrane domains of chloramphenicol resistant protein

3 讨论

通过构建基因组 DNA 文库, 筛选到了粘质沙雷氏菌 KMR3 菌株的氯霉素抗性基因, 提取质粒转化 *E. coli* DH5 α 后, 发现 *E. coli* DH5 α 对氯霉素的耐受性由 0 μ g/mL 提高到了 20 μ g/mL, 因此本实验成功克隆到了粘质沙雷氏菌 KMR3 菌株的氯霉素抗性基因。通过 NCBI 中的 Blast 比对, 初步确定了是多药排出系统蛋白 MdtL 中的 PRK10473 蛋白。所克隆到的氯霉素抗性基因(ORF 398aa), 与变形斑沙雷氏菌 (*Serratia proteamaculans* 568) Bcr/CfIA 亚家族药物抗性转运蛋白同源性最高, 达到 92%; 与小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081)推断的多药抗性蛋白的同源性达到 79%。

PRK10473 蛋白是胞质膜蛋白 MdtL 中的一种, 为多药/氯霉素转运蛋白^[5], 属于 MFS (Major facilitator superfamily)超家族, Bcr/CfIA 亚家族的成员, MdtL 的大量表达具有低水平的氯霉素抗性。MFS 超家族

为二级转运蛋白, 由质子原动力提供能量, 具有 12~14 个跨膜区域, 参与同向转移、反向运输及各种底物的单向转运(如糖、Krebs 循环之间产物、磷酸酯、寡聚糖及抗生素)^[6,7]。该家族成员主要包括 Bcr (大肠杆菌)、EmrB (大肠杆菌)、EmrD (大肠杆菌)、MdfA/Cmr(大肠杆菌)、NorA (金黄色葡萄球菌)、QacA(金黄色葡萄球菌)和 Bmr (枯草芽孢杆菌) 等^[8-10], 这些系统通过不同的特异性介导药物排出, 其中该家族的许多蛋白可以排出抗生素及其他的小分子^[4]。Bcr/CflA 亚家族包含 685 种蛋白质, 包括 *E. coli* 的双环霉素抗性蛋白 Bcr、鼠伤寒沙门氏菌的氯霉素和氟苯尼考抗性蛋白 Flor 及假单胞菌属质粒 R1033 上的氯霉素抗性蛋白 CmlA 等, 均具有 12 个跨膜区域。本研究通过构建低温粘质沙雷氏菌 KMR3 菌株的基因组 DNA 文库, 成功克隆到了该菌的氯霉素部分抗性基因, 并对其部分特性进行研究。预测软件及人工分析均未发现终止子终止子区域, 可能是由于该蛋白由多个基因簇编码, 而实验中只克隆到其中一部分而致。根据蛋白比对及跨膜结构预测的结果, 可以进一步推断 KMR3 菌株的氯霉素抗性蛋白可能由基因簇编码。本文将为研究氯霉素的抗性机制及进一步防治医院内沙雷氏菌的感染提供一定的理论依据。

REFERENCES

- [1] Wei YL, Ji XL, Lin LB, Jing SR, Li G. Isolation and identification of a *Serratia* strain with universal resistance. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2007, **29**(S1): 398-402.
魏云林, 季秀玲, 林连兵, 井申荣, 李光. 一株广谱抗性沙雷氏菌的分离和鉴定. 云南大学学报 (自然科学版), 2007, **29**(S1): 398-402.

- [2] F 奥斯伯, R 布伦特, RE 金斯顿, DD 穆尔, JG 赛德曼, JA 史密斯, K 斯特拉尔. *Short Protocols in Molecular Biology*. Beijing: Science Press, 1998. **39**.
- [3] Wei YL, Lin LB, Ji XL, Jing SR. Construction of promoter probe vector for a cold-adapted bacterium, *Acinetobacter* sp. DW6. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, **23**(3): 530-534.
魏云林, 林连兵, 季秀玲, 井申荣. 低温菌启动子探针载体的构建. 生物工程学报, 2007, **23**(3): 530-534.
- [4] Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock Robert EW. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, **43**(5): 1085-1090.
- [5] Hayes ET, Wilks JC, Sanfilippo P, Yohannes E, Tate DP, Jones BD, Radmacher MD, BonDurant SS, Slonczewski JL. Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters, and envelope composition in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiology*, 2006, **6**: 89
- [6] Li LG, He ZY, Pandey GK, Tsuchiya T, Luan S. Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(7): 5360-5368.
- [7] Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2001, **183**(20): 5803-5812.
- [8] Nilsen IW, Bakke I, Vader A, Olsvik O, El-Gewely MR. Isolation of cmr, a novel *Escherichia coli* chloramphenicol resistance gene encoding a putative efflux pump. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 3188-3193.
- [9] Rouch DA, Cram DS, DiBerardino D, Littlejohn TG, Skurray RA. Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. *Mol Microbiol*, 1990, **4**: 2051-2062.
- [10] Neyfakh AA, Bidnenko VE, Chen LB. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 4781-4785.

本期广告索引

企业	版位	企业	版位
默克化工技术(上海)有限公司	封底	生物谷网站	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	上海国强生化工程装备有限公司	内页
富士胶片(中国)投资有限公司	封三, 内页	大连亚博会展有限公司	内页
美国 Promega 公司	内页	镇江东方生物工程公司	内页
杭州博日科技有限公司	内页	赛默飞世尔科技有限公司	内页