

铜绿假单胞菌新基因 *PA0058* 插入失活对 氨基糖苷类抗生素耐药性的影响

王雪涵 刘力伟 李明轩 张秀明 白艳玲 徐海津 乔明强*

(南开大学 生命科学学院 天津 300071)

摘要:【目的】铜绿假单胞菌是一种重要的条件致病菌,临床上常引起难治性和顽固性感染,随着各种抗生素的广泛使用,该菌对多种抗生素呈现耐药性,研究其耐药性机理有着重要意义。【方法】以一株临床分离株 *Pseudomonas aeruginosa* PA68 作为出发菌株,应用人工 Mu 转座技术构建突变文库并从中筛选得到一株对链霉素抗性明显增强的菌株 M122,并对突变株 M122 进行测序分析及表型检测。通过 Southern 杂交实验证实转座子是否为单拷贝插入,对突变株 M122 的基因表达谱与野生型 PA68 菌株进行对比分析。

【结果】确定了 Mu 转座子在 M122 基因组上为单拷贝插入,插入位点为基因 *PA0058* 的第 214 bp 处。对 M122 进行表型检测,发现其对多种氨基糖苷类抗生素的耐药性均得到增强,通过转入携带完整基因 *PA0058* 的表达质粒可以使突变株 M122 的耐药性有所降低,利用同源重组的方法,在模式菌株 *P. aeruginosa* PAK 中进行 *PA0058* 基因敲除,得到的敲除株具有链霉素耐药性升高的表型。基因 *PA0058* 的缺失引起多种基因表达水平改变,尤其是 *katB*、*ahpC*、*ahpF* 等抗氧化酶基因转录表达显著增高。【结论】首次发现铜绿假单胞菌 *PA0058* 基因的插入失活提高了细菌对氨基糖苷类抗生素的耐药性,且导致突变株 M122 中抗氧化酶基因转录表达水平的上调。

关键词: 铜绿假单胞菌, Mu 转座, *PA0058*, 氨基糖苷类抗生素抗性

*通讯作者: Tel: 86-22-23503340; 信箱: mingqiangqiao@yahoo.com

收稿日期: 2011-12-09; 接受日期: 2012-02-28

Effects of insertional inactivation of novel gene *PA0058* on the aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

WANG Xue-Han LIU Li-Wei LI Ming-Xuan ZHANG Xiu-Ming
BAI Yan-Ling XU Hai-Jin QIAO Ming-Qiang*

(The College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: [Objective] *Pseudomonas aeruginosa* is a typical opportunistic pathogen which often causes serious and persistent infections in hospitals. As antibiotics have been used extensively and constantly, *P. aeruginosa* developing higher multi-drug resistance. Hence, investigating the mechanisms of antibiotic resistance in *P. aeruginosa* has significant clinical value. **[Methods]** A clinical isolated strain PA68 was adopted to construct a Mu transposon insertion mutant library. One mutant strain named M122 with abnormally high streptomycin resistance was isolated from the library. Southern blotting confirmed that the insertions had occurred as single event. DNA microarray was used to analyze the genomic expression in M122. **[Results]** Gene cloning and sequencing indicated that the alteration of M122 phenotype was due to the insertional activation of a novel gene *PA0058*. Mutation of *PA0058* gene resulted in a higher resistance to several kinds of aminoglycoside antibiotics. After transforming a plasmid containing gene *PA0058* into M122, the resistance phenotype restored partially. To exclude the strain specific, gene *PA0058* was knocked-out in *P. aeruginosa* PAK. The results indicated that the mutation of gene *PA0058* causes multiple gene expression change in *P. aeruginosa*, especially the significantly up-regulated antioxidant enzyme genes. **[Conclusion]** This is the first time the gene *PA0058* was identified and reported to be involved in upward aminoglycoside resistance in *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Mu transposition, *PA0058*, Aminoglycoside resistance

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA), 又称绿脓杆菌, 广泛分布于自然界、人体的皮肤、肠道和上呼吸道中^[1]。铜绿假单胞菌是一种重要的条件致病菌, 也是引起严重的医院内获得性感染的常见病原菌之一^[2-3]。该菌也常引发慢性支气管炎及囊性纤维化继发感染等疾病, 是严重烧伤、创伤感染病人、囊性纤维化病人及晚期肿瘤患者死亡的重要原因之一, 严重危害着人类的健康和生命^[4-5]。随着临床抗生素药物应用的日益广泛, 多耐药铜绿假单胞菌的出现, 给医院有效的抗感染治疗带来极大的困扰。因此, 研究其耐药

机理对于预防和治疗由铜绿假单胞菌引起的感染有重要的意义。

近年来, 国内外陆续发现多个铜绿假单胞菌耐药性相关基因。赵兴艳等发现新基因 *PA2580* 和 *PA2800* 可能分别通过参与细胞氧化还原作用和细胞壁合成进而与铜绿假单胞菌的耐药性相关^[6]。陈林等筛选了铜绿假单胞菌转座突变体文库, 确定了 45 个与内在耐药性相关的基因, 其中菌毛合成基因 *pilY1* 的缺失导致菌株对羧苄青霉素的 MIC 增加了 128 倍^[7]。Yuji Morita 等研究发现, *PA5471* 基因突变使得铜绿假单胞菌对庆大霉

素抗性变弱,而在野生株中过表达 *PA5471* 基因后,引起了外排泵基因 *mexX* 转录上升^[8]。Coban 等报道 *qnr* 基因与铜绿假单胞菌对喹诺酮类抗生素的耐药性有关^[9]。Struble 等发现基因簇 *PA4943-PA4946* 和 *PA0960-PA0963* 的拷贝数增加将导致铜绿假单胞菌产生 3 种氨基糖苷类抗生素抗性(丁胺卡那霉素、庆大霉素、妥布霉素)^[10]。

通过对铜绿假单胞菌耐药性相关基因的研

究,能够更深入地认识细菌产生耐药性的机制和代谢途径等,为新药物的设计和研发提供理论依据,最终能针对性地设计药物用以治疗和抑制铜绿假单胞菌所引发的感染。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 文中使用的菌株和质粒见表 1。

表 1 使用的菌株和质粒 Table 1 Strains and plasmids		
菌株/质粒 Strains/plasmids	特征 Characteristics	来源或参考文献 Source/ References
PA68	铜绿假单胞菌临床分离株, 对链霉素敏感	本室保存
M122	<i>P. aeruginosa</i> PA68 的 Mu 插入突变株(PA0058::Mu), 链霉素抗性提高	本室构建
PAK	铜绿假单胞菌标准株, 对链霉素敏感	本室保存
PAKΔ0058	<i>P. aeruginosa</i> PAK 的缺陷株(Δ0058)。	本室构建
M122P	携带表达质粒 pDN18-0058C 的突变株 M122	本室构建
M122B	携带质粒 pDN18 的突变株 M122	本室构建
pEX-Δ0058	同源重组实验用载体, 含部分缺失的 <i>PA0058</i> 基因	本室构建
pDN18-0058P	遗传互补实验用载体, 含完整 <i>PA0058</i> 基因	本室构建

1.1.2 试剂: 蔗糖(Sucrose)购自美国 Sigma 公司, 假单胞菌分离琼脂(*Pseudomonas* Isolation Agar, PIA)购自美国 Difco 公司, 四环素、链霉素、氨基苄青霉素等抗生素购自鼎国生物制品公司, 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DNA 分子量标准、IPTG 和 X-Gal 均为 TaKaRa 公司产品, 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 突变株 M122 的表型检测

1.2.1 鞭毛介导的泳动能力检测: 根据 Rashid 等的方法^[11], 挑取新鲜培养的 PA68 和 M122 菌落, 点种到泳动培养基的表面, 30 °C 正置培养 14-16 h, 观察野生型 PA68 与突变株 M122 泳动能力的差异。

1.2.2 IV 型菌毛介导的蹭行运动能力检测: 根据 Rashid 等的方法^[11]挑取 LB 平板上新鲜培养的

PA68 和 M122 菌落, 接种到培养基下面的塑料平皿上, 37 °C 培养 16-18 h; 轻轻移去培养基, 在塑料平皿内倒入考马斯亮兰染色液染色 20 min。倒掉染液, 用自来水轻轻冲洗平皿 1 min, 此时可观察到细菌因蹭行运动而产生的圆形菌晕被染成蓝色。

1.2.3 生物被膜的分析: 静态生物被膜形成的分析参照 Kulasakara 的方法^[12]进行。生长到对数生长期的菌液转接到 5 mL LB 液体培养基中(16 mL 试管), 初始浓度稀释到 *OD*₆₀₀ 为 0.002, 30 °C 静置培养 20 h。轻轻倒掉培养基和表面的菌膜, 用水冲洗试管 2 次, 在试管内加入 0.1% 的结晶紫染色, 之后再用水冲洗没有结合的染料。每个菌株都重复检测 3 次以上。

1.2.4 抗生素对菌株的最小抑菌浓度(MIC): 采

用微量稀释法测定^[13]。将隔夜液体培养基的细菌按 1:1 000 稀释后取 200 μ L 加入 96 孔微量滴定板的第 1 孔,然后在 2–10 孔各加入 100 μ L 菌液。在第 1 孔内加入设定浓度的抗生素,混匀后取 100 μ L 加入第 2 孔内,按此方法依次稀释到最后一个孔。37 $^{\circ}$ C 培养 20 h 后观察,测定 MIC 值。

1.3 Southern blot 实验

对 Mu 插入突变株 M122 进行 Southern 印迹杂交实验来确证 Mu 转座子是单点插入基因组 DNA 中的。Southern 杂交实验参照《分子克隆》的方法进行^[14],提取野生型 PA68 和突变株 M122 的基因组 DNA,分别用 *Apa* I、*Eco*R I 和 *Kpn* I 3 种内切酶进行酶切后用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离,将 DNA 从凝胶中转移到尼龙膜上, DNA 固定在尼龙膜上后 4 $^{\circ}$ C 保存。以携带人工 Mu 转座子 DNA 的质粒 pHTH2 为模板, Mu1 (5'-GCCGCTGATCATCTAGAGA-3') 和 Mu2 (5'-TCCCACCAGCTTATATACCT-3') 为引物。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳分离后回收纯化 PCR 产物,按照罗氏地高辛标记试剂盒 (Roche: DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit) 说明书进行标记后做为 Southern 杂交实验的探针,杂交及洗膜显色的步骤按照该试剂盒说明书进行。

1.4 遗传互补实验

1.4.1 表达载体 pDN18-0058P 的构建:以 PA68 基因组 DNA 作为模板,以 0058P1 (5'-CGGAATTCACCCCTCAGCACTATCTACATCA-3') 和 0058P2 (5'-GCTCTAGACCTCGAAGCGGGTATTG-3') 为引物,PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 62 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 100 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 *Eco*R I 和 *Xba* I 酶切后连接到克隆载体 pUC18 上。提取质粒 pUC18-0058P,经 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切,1.0% 凝胶电泳分离后,

回收约 1.6 kb 的 PA0058P 片段;将该片段与经 *Eco*R I 和 *Xba* I 酶切处理后的载体 pDN18 连接;连接产物转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,用 PCR 和质粒酶切的方法检测阳性转化子。构建的表达质粒命名为 pDN18-0058P,用于突变株 M122 的遗传互补实验。

1.4.2 互补株表型检测:取 50 ng 的 pDN18-0058P 质粒电转化入突变株 M122 的感受态细胞中,用 LB (200 mg/L Tc) 固体平板培养, 37 $^{\circ}$ C 培养 14–16 h。PCR 和质粒酶切检测转化子,携带有 pDN18-0058P 表达质粒的 M122 突变株命名为 M122P。以空载体 pDN18 质粒转化入突变株 M122 的感受态细胞中,筛选携带有载体 pDN18 质粒的转化子,命名为 M122B,做为阴性对照。挑取铜绿假单胞菌株 PA68、M122、M122P 和 M122B 的单菌落,转接 5 mL LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 过夜振荡培养;次日按 1:100 转接到含有 100 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养约 3–5 h,在 OD_{540} 为 0.5–0.6 时,停止培养;取 10 μ L 的菌液加入到融化后的固体培养基中(30 mL, 50 $^{\circ}$ C),摇匀后倒入玻璃平皿中;待培养基凝固后加入抗生素纸片, 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h 后,测定抑菌圈大小。以 PA68 为阳性对照, M122B 为阴性对照,观察突变株 M122P 的耐药性能否由于 PA0058 基因的表达而得到恢复。

1.5 同源重组实验

1.5.1 重组质粒 pEX- Δ 0058 的构建:以铜绿假单胞菌 PAOI 基因组 DNA 为模板,在 PA0058 基因上游和下游各设计一对引物 0058U1/U2 和 0058D1/D2, PCR 扩增得到长度为 995 bp 的 0058U 片段和 606 bp 的 0058D 片段,经酶切纯化后克隆到质粒 pUC18 上,得到 pUC18- Δ 0058。质粒 pUC18- Δ 0058 经 *Eco*R I 和 *Xba* I 酶切后,将大小 1.6 kb 的 Δ 0058 片段克隆到 pEX18Tc 载体上。筛选阳性转化子,并酶切检测,得到重组质粒

pEX- $\Delta 0058$ 。

1.5.2 基因敲除菌株 PAK $\Delta 0058$ 的构建:以接合转移的方法将重组质粒 pEX- $\Delta 0058$ 转入铜绿假单胞菌 PAK 中。以 Tc100 平板筛选单交换株,挑取一单交换子接种于 3 mL 无抗生素 LB 培养基, 37 °C 培养 8 h, 将培养液稀释 100 倍涂含 5% 蔗糖的 PIA 平板, 挑取 PIA 平板上的单菌落, 37 °C 过夜培养, 以 0058rF (5'-GCTCTAGAGATGAACGA CCTCACCTGC-3') 和 0058rR (5'-CGGAATTCC ACGGCAGTGATGGCGAAA-3') 为引物, 进行菌液 PCR。反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 1 min, 63 °C 45 s, 72 °C 1 min 10 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。检测双交换的基因型, 得到的阳性菌株命名为 PAK $\Delta 0058$ 。

1.5.3 PAK $\Delta 0058$ 抗生素抗性表型的检测:采用微量稀释法测定链霉素对铜绿假单胞菌株 PA68、M122、PAK 和 PAK $\Delta 0058$ 的 MIC。取 1 000 倍稀释的过夜培养菌液加入 96 孔微量滴定板各孔内, 在第 1 孔内加入终浓度为 512 mg/L 的链霉素, 逐孔 2 倍稀释至 4 mg/L。37 °C 培养 20 h 后测定链霉素对 PA68、M122、PAK 和 PAK $\Delta 0058$ 各菌株的 MIC 值。

1.6 基因表达谱的获得

TRIZOL 法提取菌株 PA68 和 M122 的总 RNA, 采用 RNeasy 试剂盒(QIAGEN)结合 DNase I 清除 DNA 模板。以 Random Primers 为引物, 在反转录酶的作用下, 由 10 μ g total RNA 反转录成单链 cDNA, 同时掺入 poly-A control。利用试剂盒 (Qiagen MinElute PCR Purification Kit) 对 cDNA 进行纯化, 用 DNase I 将纯化的 cDNA 切成 50–200 bp 的片段。在末端转移酶的作用下, 将片段化后的 cDNA 产物 3' 端带上生物素标记。根据芯片类型配制适当量的杂交液, 先进行测试芯片的杂交、洗染和分析, 在洗涤工作站 FS450 上运行相应程序, 对芯片进行清洗、染色和信号放大。

用 Scanner 3000 7G 4C 扫描仪上芯片对芯片进行扫描和信号值转换。

1.7 突变株 M122 对氧化剂、还原剂的敏感性实验

采用微量稀释法测定 M122 对 H₂O₂、DTT 和维生素 C 的敏感性, 取 1 000 倍稀释的过夜培养的 PA68 和 M122 菌液接种于含不同浓度氧化剂和还原剂的 LB 培养基中。(1) 含终浓度分别为 15%、7.5%、5%、3% 和 1% H₂O₂ 的 LB 培养基; (2) 含终浓度分别为 50.000、25.000、12.500、6.250 和 3.125 mmol/L DTT 的 LB 培养基; (3) 含终浓度分别为 5.0、4.5、4.0、3.5 和 3.0 g/L 维生素 C 的 LB 培养基。

2 结果

2.1 突变株 M122 的表型

用泳动检测培养基和蹭行运动检测培养基分别检测 M122 的泳能力和蹭行运动能力, 与野生株 PA68 相比, M122 菌株的蹭动能力略有减弱 (图 1), 而泳动能力基本正常。静态生物被膜形成实验结果显示, M122 菌株与野生株 PA68 在生物被膜的厚度和形态基本一样, 表明 PAK $\Delta 0058$ 基因的失活不影响生物被膜的形成。抗生素耐药性检测结果显示, 突变株 M122 对几种氨基糖苷类抗生素具有较高的耐药性 (表 2), M122 对链霉素的

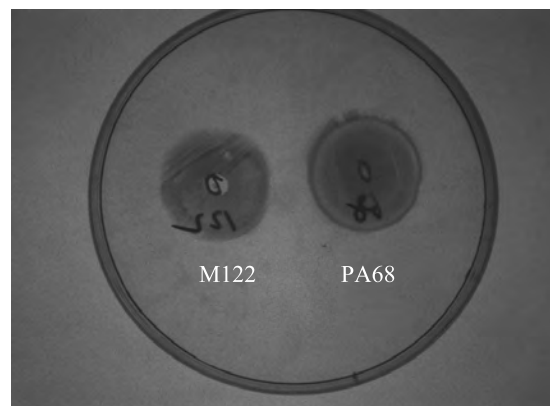


图 1 蹭动能力检测

Fig. 1 Twitching motility assay

表 2 各种抗生素对 PA68 和 M122 的 MIC
Table 2 MIC of antibiotic to PA68 and M122

抗生素 Antibiotics	PA68 (mg/L)	M122 (mg/L)	抗生素种类 Types of antibiotics
庆大霉素 Gentamycin	1.562	6.250	氨基糖苷类
链霉素 Streptomycin	12.500	200.000	氨基糖苷类
卡那霉素 Kanamycin	2.344	600.000	氨基糖苷类
新霉素 Neomycin	100.000	200.000	氨基糖苷类
壮观霉素 Spectinomycin	3.125	400.000	氨基糖苷类
羧苄霉素 Carbenicillin	75.000	75.000	β -内酰胺类
头孢锌钠 Cefuroxime Sodium	400.00	400.000	β -内酰胺类
氨曲南 Aztreonam	6.250	3.125	β -内酰胺类
四环素 Tetracycline	25.000	12.500	
氯霉素 Chloromycetin	200.000	100.000	
环丙沙星 Ciprofloxacin	$5.000 \times (0.5)^7$	$5.000 \times (0.5)^6$	喹诺酮类

耐药性是野生型菌株 PA68 的 16 倍; 另外, 对庆大霉素、新霉素和壮观霉素的耐药性分别增长了 4 倍、2 倍和 128 倍。然而, M122 与 PA68 对 β -内酰胺类抗生素的耐药性则无明显差别, 同样的现象也发生在对四环素、氯霉素和喹诺酮类抗生素的耐药性上。因此, 我们认为与野生型 PA68 相比, 突变株 M122 特异地对氨基糖苷类抗生素具有较高的耐药性。

2.2 Mu 转座子单点插入的确认

Mu 转座重组系统具有体外组装、体内重组的特点, 与传统转座子相比的优点之一是能够保证转座子的单点插入, 用 Southern 印迹杂交实验验证在突变株 M122 中 Mu 转座子在基因组中是否为单点插入基因 *PA0058*。提取野生型菌株 PA68 和 M122 的基因组 DNA, 分别用 *Apa* I、*Eco*R I 和 *Kpn* I 3 种内切酶进行酶切后用 0.8% 琼

脂糖凝胶电泳分离, 由于作为探针的 Kan-Mu 片段上没有 *Apa* I、*Eco*R I 和 *Kpn* I 的酶切位点, Southern blot 实验结果显示探针和酶切后的 M122 基因组 DNA 杂交后只出现一条杂交带 (图 2), 表明所得到的 M122 突变株中 Mu 转座子 DNA 均以单拷贝形式整合到基因组中, 证明了突变株 M122 表型的改变与 Mu 转座子插入位点处相应基因突变的对应关系。

2.3 遗传互补菌株 M122P 与基因敲除株 $\Delta PA0058$ 的耐药性表型

如表 3 所示, 遗传互补菌株 M122P 对氨基糖苷类抗生素的耐药性部分恢复到野生株 PA68 的水平, 30 mg 链霉素和 10 mg 庆大霉素对 M122P 产生的抑菌圈直径为 20.18 mm 和 19.62 mm, 显著高于突变株 M122 的 17.58 mm 和 17.33 mm, 表明基因 *PA0058* 与铜绿假单胞菌的氨基糖苷类抗生

素耐药性的变化相关。但是,上述数据与抗生素对 PA68 产生的直径为 29.75 mm 和 20.24 mm 的抑菌圈相比仍有差距,氨基糖苷类抗生素耐药性升高的表型在遗传互补菌株 M122P 中部分地恢复了。

PAKΔ0058 的链霉素耐药性检测结果(表 4)显示,链霉素对 PAK 和 PAKΔ0058 的 MIC 分别为 16 mg/L 和 64 mg/L,与野生型相比,敲除株对链霉素的耐药性升高了 4 倍,这一表型与 Mu 插入突变株 M122 是一致的。在菌株 PA68 和 PAK 中,基因 PA0058 的失活均使链霉素的耐药性升高,这表明基因 PA0058 与铜绿菌株氨基糖苷类抗生素耐药性改变是有关的,且在不同背景菌株中的表现是一致的,即有不同程度的升高。

2.4 突变株 M122 对氧化剂、还原剂的敏感性

M122 菌株能够在含 15.0% H₂O₂ 的 LB 培养基中生长,而 PA68 只能在含有浓度为 7.5% 及更低浓度 H₂O₂ 的 LB 培养基中生长;25.0 mmol DTT 能够抑制 PA68 的生长,而只需 12.5 mmol DTT 就可以抑制 M122 的生长;当 LB 培养基含有

5 g/L 维生素 C 时,PA68 能够正常生长, M122 的生长受到抑制或不生长。

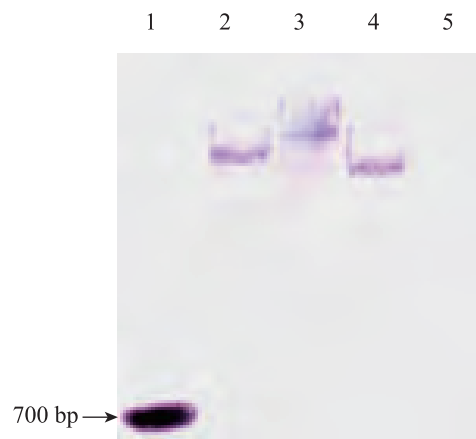


图 2 基因组 DNA 与人工 Mu 转座子 Southern blot 实验结果

Fig. 2 Analysis of single insertion by Southern blot
注: 1: 阳性对照, PCR 扩增的 700 bp 的 Kan-Mu 片段; 5: 阴性对照, 经 *EcoR* I 酶切的 PA68 基因组 DNA; 2、3、4 分别为 M122 用 *Apa* I, *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切的产物。

Note: 1: 700 bp PCR generated Kan-Mu fragment as positive control; 2, 3, 4 in picture are genomic DNA of M122 digested with *Apa* I, *EcoR* I and *Kpn* I; 5: Genomic DNA of PA68 digested with *EcoR* I as negative control.

表 3 抑菌圈测定结果				
Table 3 The result of antibacterial circle measurement				
抑菌圈直径 Antibacterial circle diameter (mm)	PA68	M122	M122B	M122P
链霉素 Streptomycin	29.75	17.58	19.70	20.18
庆大霉素 Gentamycin	20.24	17.33	19.44	19.62

表 4 基因敲除株 PAKΔ0058 的链霉素 MIC								
Table 4 MIC of streptomycin to PAKΔ0058								
抗生素浓度 Antibiotic concentration (mg/L)	512	256	128	64	32	16	8	4
PA68	—	—	—	—	—	—	+	+
M122	—	—	+	+	+	+	+	+
PAK	—	—	—	—	—	—	+	+
PAKΔ0058	—	—	—	—	+	+	+	+

3 讨论

铜绿假单胞菌菌株 M122 是 Mu 转座子插入失活 PA68 菌株的基因 PA0058 而得到的突变株,其表型为链霉素耐药性上升。与野生型菌株 PA68 相比, M122 的链霉素耐药性上升 16 倍,对庆大霉素、新霉素、壮观霉素等氨基糖苷类抗生素的耐药性均有不同程度的升高。Southern 杂交实验,验证了 M122 菌株中 Mu 转座子为单拷贝插入基因 PA0058 中。遗传互补实验中,完整 PA0058 基因的导入使得突变株 M122 的耐药性得到一定程度的恢复,虽然未能完全恢复到野生型的水平,但可以说明基因 PA0058 与氨基糖苷类抗生素耐药性升高的表型之间的关联。通过同源重组实验敲除了模式菌株 PAK 中的 PA0058 基因,与插入突变株 M122 一样 PAK Δ 0058 也呈现链霉素抗性升高的表型。遗传互补实验和同源重组两个实验从正反两个方面证实基因 PA0058 是一个与铜绿假单胞菌氨基糖苷类抗生素耐药性相关的新基因。这是首次报道新基因 PA0058 的插入失活影响了铜绿假单胞菌对氨基糖苷类抗生素的耐药性。

对菌株 PA68 和 M122 基因表达情况进行微阵列基因芯片分析,以 PA68 芯片为基准, M122 与 PA68 芯片之间共发现 398 个探针有显著差异,代表 392 个基因。我们重点研究 M122 中表达量变化幅度较大且可能与抗生素耐药性相关的基因,值得注意的是,在 M122 中编码过氧化氢酶的基因 *katB* 与编码烷基过氧化物还原酶的基因 *ohr*、*ahpC* 和 *ahpF* 的转录水平均显示了 2 倍及以上的变化。抗氧化基因的表达,包括 *katB*、*ahpB* 和 *ahpCF* 受到特异的氧化压力响应系统的调控,在铜绿假单胞菌中该系统由能够感应 H_2O_2 的反式作用因子 OxyR 调控^[15]。OxyR 通过分子内二硫键的形成导致的结构变化使其与启动子调节

区的结合状态发生改变并最终导致转录的启动,从而对胞内氧化压力信号做出反应,这一反应的表型包括对 H_2O_2 和氨基糖苷类抗生素的抗性^[16]。基因 PA0058 的表达产物预测为一种二硫键氧化还原酶,二硫键氧化还原酶能够催化二硫键的氧化、还原与异构。突变株 M122 对氧化剂、还原剂的敏感性实验表明,基因 PA0058 的失活导致 M122 对氧化剂 H_2O_2 的耐受性增高,而对还原剂 DTT 和维生素 C 变得更加敏感,这说明基因 PA0058 的失活可能导致了铜绿假单胞菌细胞内氧化还原水平的变化,这与推测的 PA0058 表达产物是一种二硫键氧化还原酶指向了同一个方向,即基因 PA0058 参与了细胞内的氧化还原反应。突变株 M122 的基因表达谱分析显示, M122 中由 OxyR 调控的氧化压力响应系统中的几个成员转录水平有所升高,该系统能对胞内氧化压力信号做出响应,并产生某些表型的改变,其中包括对氨基糖苷类抗生素耐药性的增高,这与 M122 氨基糖苷类抗生素耐药性增高的表型是相符的。基因 PA0058 究竟如何参与细胞内的氧化还原过程,这一过程与 OxyR 调控的氧化压力响应系统及氨基糖苷类抗生素耐药性升高之间的具体联系需要进一步研究。

参考文献

- [1] 宋玉兰,赵丽,申子路,等.铜绿假单胞菌耐药机制研究现状[J].中华医院感染学杂志,2010,20(6):898-890.
- [2] Hatano K, Pier GB. Complex serology and immune response of mice to variant high-molecular-weight O polysaccharides isolated from *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O₂ strains[J]. Infection and Immunity, 1998, 66(8): 3719-3726.
- [3] Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, et al. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2005,

- 171(11): 1209–1223.
- [4] Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, et al. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Clinical Infectious Diseases, 1983, 5(2): 279–313.
- [5] Rotschafer JC, Shikuma LR. *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility in a university hospital: recognition and treatment[J]. The Drug Intelligence and Clinical Pharmacy, 1986, 20(7/8): 575–581.
- [6] 赵兴艳, 梁海华, 沈立新, 等. 铜绿假单胞菌多重耐药基因的筛选及鉴定[J]. 微生物学报, 2008, 48(8): 1019–1024.
- [7] 陈林, 杨亮, 赵兴艳, 等. 铜绿假单胞菌耐药性相关基因的筛选及鉴定[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(10): 978–982.
- [8] Morita Y, Sobel ML, Poole K. Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(5): 1847–1855.
- [9] Coban AY, Tanrıverdi Çaycı Y, Yildirim T, et al. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients[J]. Mikrobiyoloji Bulteni, 2011, 45(4): 602–608.
- [10] Struble JM, Gill RT. Genome-scale identification method applied to find cryptic aminoglycoside resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Plos One, 2009, 4(11): e6576.
- [11] Rashid MH, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(9): 4885–4890.
- [12] Kulasakara H, Lee V, Brenic A, et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis- (3'-5')-cyclic-GMP in virulence[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(8): 2839–2844.
- [13] Firsov AA, Vostrov SN, Shevchenko AA, et al. MIC-based interspecies prediction of the antimicrobial effects of ciprofloxacin on bacteria of different susceptibilities in an in vitro dynamic model[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, 42(11): 2848–2852.
- [14] Sambrook J, Russell DW, Irwin N. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2000.
- [15] Ochsner UA, Vasil ML, Alsabbagh E, et al. Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of *katB-ankB*, *ahpB*, and *ahpC-ahpF*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(16): 4533–4544.
- [16] Hassett DJ, Alsabbagh E, Parvatiyar K, et al. A protease-resistant catalase, KatA, released upon cell lysis during stationary phase is essential for aerobic survival of a *Pseudomonas aeruginosa oxyR* mutant at low cell densities[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(16): 4557–4563.