

研究报告



云南土壤宏基因组文库中替加环素耐药基因的筛选与分析

雷蕾 冯治洋*

南京农业大学食品科技学院 江苏 南京 210095

摘要:【背景】随着抗生素的广泛应用以及滥用,出现了多重耐药的“超级细菌”,并且在临床上已出现对治疗“超级细菌”感染的最后一线抗生素——替加环素耐药的细菌。【目的】对土壤环境中存在的替加环素耐药基因进行筛选调查,探讨替加环素耐药机制,为临床抗生素治疗提供借鉴。【方法】利用功能宏基因组学技术对土壤宏基因组文库进行替加环素耐药阳性克隆的筛选和耐药亚克隆的构建,对构建成功的亚克隆进行测序和生物信息学分析探知其功能,同时进行最低抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)的测定。【结果】筛选得到一个四环素抗性 Major Facilitator Superfamily (MFS)外排泵基因,携带该基因的菌株对四环素类抗生素均耐药,对替加环素和四环素的 MIC 值分别为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。当 MFS 外排泵抑制剂羰基氰化物间氯苯腙(Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone, CCCP)浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可以抑制其对四环素类抗生素的外排作用。生物信息学结果表明该基因编码 483 个氨基酸,编码的蛋白质属于疏水稳定蛋白;其含有的 14 个跨膜区构成 MFS 外排泵蛋白典型的 14 次跨膜螺旋保守结构域;系统进化树分析表明其与其他替加环素耐药基因编码的蛋白质位于不同的分支上,相似性较低。【结论】利用功能宏基因组学技术筛选得到一个有替加环素抗性的 MFS 外排泵基因,编码的蛋白质属于 14 次跨膜螺旋 MFS 外排泵家族,为今后研究替加环素耐药机制提供参考。

关键词: 土壤, 功能宏基因组学, 替加环素耐药基因, Major Facilitator Superfamily 外排泵

Screening and analysis of tigecycline resistance genes from Yunnan soil metagenomic library

LEI Lei FENG Zhiyang*

College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

Abstract: [Background] With the wide application and abuse of antibiotics, the “super bacteria” resistant to almost all antibiotics emerged. And clinically, bacteria resistant to tigecycline, the current last line of defense to treat “super bacteria” infections, had emerged too. [Objective] To screen tigecycline resistance genes from the soil and study the resistant mechanism, providing the reference for clinical antibiotic treatment. [Methods] Functional metagenomics technology was used to obtain tigecycline resistance clone, and subcloning and sequencing were used to identify the tigecycline resistance gene. The characteristics of physicochemical properties, protein secondary structure, transmembrane domain, and

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31770049)

*Corresponding author: Tel: 86-25-84399511; E-mail: zfeng@njau.edu.cn

Received: 03-11-2020; Accepted: 26-11-2020; Published online: 24-12-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31770049)

*通信作者: Tel: 025-84399511; E-mail: zfeng@njau.edu.cn

收稿日期: 2020-11-03; 接受日期: 2020-11-26; 网络首发日期: 2020-12-24

system evolution analysis of the resistant gene were analyzed by bioinformatics methods. Besides, the determination of minimum inhibitory concentration was performed. **[Results]** A gene encoding tetracycline resistance MFS efflux pump was identified and the *E. coli* harboring this gene showed resistance to tigecycline and tetracycline with the MIC values of 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The efflux activity of the protein was inhibited by 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MFS efflux pump inhibitor CCCP. The predictive protein encodes 483 amino acids and belongs to hydrophobins and stable proteins. And it contained 14 transmembrane regions which formed a typical 14-times transmembrane spiral MFS efflux pump conserved domain. Phylogenetic tree analysis showed that the protein was located on different branches and showed low homology with other protein encoded by tigecycline resistance genes. **[Conclusion]** A tigecycline resistance MFS efflux pump gene was obtained using functional metagenomics technology. The protein encoded by the gene belonged to 14-times transmembrane spiral MFS efflux pump family, and this study provided reference on future study of the mechanism of tigecycline resistance.

Keywords: soil, functional metagenomics, tigecycline resistance gene, major facilitator superfamily efflux pump

抗生素是 20 世纪最重要的医学发现之一, 自从 1929 年弗莱明发现青霉素以来, 越来越多的抗生素逐渐被人类发现, 在人类疾病治疗和动植物养殖业上发挥着重要作用。已知的抗生素作用机制主要包括: (1) 与细菌的细胞膜相互作用从而改变细胞膜的通透性, 以这种方式作用的抗生素主要有粘菌素和短杆菌肽; (2) 抑制细菌细胞壁的合成, 如 β -内酰胺类抗生素; (3) 抑制核酸的复制和转录, 如喹诺酮类抗生素; (4) 干扰蛋白质的合成, 如四环素类抗生素^[1]。但是随着抗生素的广泛应用, 出现了抗生素的不合理使用甚至滥用的现象, 耐多种抗生素的多重耐药 (Multidrug Resistant, MDR) 菌^[2], 甚至几乎耐所有抗生素的广泛耐药 (Extensively Drug Resistant, XDR) 菌^[3]也随之出现, 这不仅会造成重大的经济损失, 也会导致临床上“无药可用”, 因此迫切需要寻找新的可以克服现有耐药机制的抗菌药物^[4]。

替加环素 (Tigecycline) 在 2005 年经美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准投入临床使用, 于 2011 年末批准在中国上市, 属于第三代四环素, 克服了传统的核糖体保护蛋白和外排泵这些四环素耐药机制^[5-6]。作为首个被批准用于临床治疗的甘氨酸环素类抗生素, 其主要针对的是多重耐药的革兰氏阴性菌引起的感

染^[7], 比如成人复杂腹腔内感染和皮肤及软组织感染^[8], 还能治疗几乎对所有抗生素 (如头孢菌素类抗生素、青霉素类抗生素, 甚至是碳青霉烯类抗生素) 都耐药的新德里金属- β -内酰胺酶 1 (New Delhi-Metallo-1, NDM-1) 超级细菌引起的感染^[8], 被誉为临床上抗感染治疗的最后一道防线。然而, 随着广泛投入临床使用, 对替加环素耐药性的报道也逐渐增多, 比如自 2007 年以来陆续有文献报道在使用替加环素治疗鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 感染时有替加环素耐药菌的出现^[9-22], 临床上近 4 年甚至出现了四环素钝化酶 Tet (X)^[22] 及其变异型 Tet (X3)^[23]、Tet (X4)^[23]、Tet (X5)^[24] 能钝化替加环素, 使菌株产生耐药性。这些耐药基因的出现和传播很可能导致替加环素治疗无效, 进一步限制治疗方案的选择, 给公众健康造成巨大威胁。

本研究采用功能宏基因组学方法从实验室已构建的云南土壤宏基因组文库中进行替加环素耐药基因的筛选, 并对基因编码的蛋白质进行生物信息学分析揭示其功能, 同时对携带耐药基因的菌株进行最低抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 的测定, 以期研究替加环素耐药机制提供参考, 为临床上新型抗生素的研发提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体

实验所用的土壤样品采集地位于 N23°44'、E101°71'的云南, 土壤宏基因组文库为 Gu 等^[25]使用 Epicentre 公司的 pWEB-TNCTM Cosmid Cloning Kit 在大肠杆菌 EPI100TM-T1^R 中构建; 文库约含克隆 1.28×10^7 个, 克隆中环境微生物 eDNA 插入片段平均大小为 38 kb; 大肠杆菌 EPI100TM-T1^R 细胞和载体 pWEB-TNC 由本实验室保存。

1.1.2 溶液的配制

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0, 纯水定容至 1 L, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

MH 肉汤培养基: 称取 MH 肉汤粉末 10.5 g 溶解于 500 mL 纯水中, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

在进行 MIC 测定时, 每种抗生素使用的终浓度如下: 替加环素为 0.062 5、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 $\mu\text{g/mL}$; 四环素、盐酸多西环素、阿莫西林、萘啶酮酸为 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0、128、256 $\mu\text{g/mL}$; 米诺环素、庆大霉素、妥布霉素为 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0、128 $\mu\text{g/mL}$; 环丙沙星为 0.007 812 5、0.015 625、0.031 25、0.062 5、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.1.3 主要试剂和仪器

氨苄青霉素 (Ampicillin) 和氯霉素 (Chloramphenicol), 上海捷瑞生物工程有限公司; 替加环素, 南京迈博生物科技有限公司; 四环素 (Tetracycline)、盐酸多西环素 (Doxycycline)、萘啶酮酸 (Nalidixic acid)、庆大霉素 (Gentamicin)、阿莫西林 (Amoxicillin)、环丙沙星 (Ciprofloxacin), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 米诺环素 (Minocycline)、妥布霉素 (Tobramycin), 南京晚晴生化仪器有限公司; 质粒小量提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; *Sau3A I*、*BamH I*、*EcoR I*、T4 DNA Ligase, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。24 孔细胞培养板

和 96 孔细胞培养板, 南京姜华化玻有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 热恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 凝胶成像仪, 上海欧翔科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 耐药阳性克隆的筛选

配制含有替加环素 2 $\mu\text{g/mL}$ 、氯霉素 15 $\mu\text{g/mL}$ 、氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$ 的液体 LB 培养基和 LB 固体培养基, 用锡箔纸包好备用。取出 24 孔细胞培养板, 每个孔中各加入 1.8 mL 的 LB 培养基, 再加入 20 μL 文库菌混匀, 将 24 孔细胞培养板放置在 37 °C 培养箱培养 1–3 d。挑取单菌落接种在 3 mL 液体 LB 培养基中, 37 °C、225 r/min 培养 16–48 h, 提取质粒并进行检测。

1.2.2 耐药亚克隆的构建

按 1:1 000 稀释好 *Sau3A I* 并对耐药阳性克隆质粒进行部分酶切, 在 140 V 电压下进行 1% 琼脂糖凝胶电泳 50 min, 紫外凝胶成像仪下检测, 切取 2–4 kb 片段进行胶回收实验。同时进行 pWEB-TNC 载体的制备, 提取 pWEB 质粒并用 *BamH I* 进行酶切, 回收 5.8 kb 大小片段, 使用 CIAP 对酶切后的回收产物去磷酸化。根据载体和目的片段的浓度, 选择载体和目的片段摩尔比为 1:3 的比例 4 °C 连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 EPI100TM-T1^R 细胞, 涂布在 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 1–2 d。挑取固体培养基上的单菌落接种于液体 LB 培养基中, 37 °C、225 r/min 培养 1–2 d 后提取亚克隆质粒。用 *EcoR I* 对亚克隆质粒进行酶切, 选取验证正确的质粒送通用生物系统(安徽)有限公司测序。

1.2.3 耐药基因的生物信息学分析

将测序结果输入 Vector NTI 10.0 软件寻找开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 并经 BLASTx 进行同源序列比对; 使用 Prot Param (<https://web.expasy.org/protparam/>) 进行蛋白质理化性质的预测; 使用 Prot Scale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 进行氨基酸序列的亲水性/疏水性分析; 使用 GOR4

(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)进行蛋白质二级结构的预测;使用 TMHMM Server V. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对蛋白质进行跨膜区预测;使用 ClustalW 软件对氨基酸序列进行多序列比对,将比对结果通过 MEGA 5.10 软件构建系统进化树;参照 Putman 等^[26]寻找氨基酸序列的保守结构域。

1.2.4 最低抑菌浓度的测定

采用微量肉汤稀释法,实验操作及结果评定均依据欧盟药敏试验标准(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)^[27],标准菌株为大肠杆菌 ATCC 25922,对照菌株为含质粒 pWEB-TNC 的大肠杆菌 EPI100TM-T1^R。先将替加环素母液用 MH 肉汤培养基按照 10 倍比稀释为 10 个梯度,依次为 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,备用。将菌液接种至 2 mL 液体 LB 培养基中,37 °C、225 r/min 培养过夜,按照 1%接种量接种至 10 mL 的 MH 肉汤培养基中,培养至 OD_{625} 值为 0.5–1.0,用 MH 肉汤培养基稀释菌液至麦氏浊度 0.5,此时 OD_{625} 值为 0.08–0.13,菌液浓度为 $(1-2)\times 10^8$ CFU/mL,再将其稀释 100 倍备用。

采用 96 孔细胞培养板,取含 64.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的替加环素 MH 肉汤培养基 100 μL 加入第 1 列孔,第 2–10 列孔中按照浓度从高到低分别加入剩余 9 个浓度的替加环素 MH 肉汤培养基。吸取菌液 100 μL 分别加入含有替加环素不同浓度的孔板中。第 11 列加菌液作为对照,第 12 列加 MH 肉汤培养基作为空白对照,试验重复 3 次。封板后 37 °C 培养箱避光培养 16–18 h 后读取药敏结果。以无细菌生长所在孔的最低替加环素浓度作为该菌株的最低抑菌浓度。

1.2.5 外排泵抑制剂羰基氰化物间氯苯胺(Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazine, CCCP)对 MIC 的影响

实验选用 CCCP 作为本次实验的外排泵抑制剂,这类抑制剂主要能够显著抑制 Major Facilitator

Superfamily (MFS)型、Small Multidrug Resistance (SMR)型外排泵蛋白活性。向装有稀释好替加环素(按 1.2.4 所述方法和浓度)的微型离心管中加入 CCCP,使其终浓度分别达到 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (此浓度经过预实验得出,除此之外预实验还进行了 CCCP 浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的实验)。测定外排泵抑制剂 CCCP 存在的情况下菌株对替加环素 MIC 的变化情况, MIC 值降至原值的 1/4 或者更低,则说明该浓度可以抑制外排泵的外排作用,该菌株为外排泵阳性株^[28]。

2 结果与分析

2.1 耐药阳性克隆的筛选和亚克隆的构建

实验通过筛选云南文库得到一个阳性克隆,对这个阳性克隆进行耐药亚克隆的构建,得到亚克隆 314-6-11,使用 *EcoR* I 酶切亚克隆质粒,根据 pWEB-TNC 的图谱寻找酶切位点,发现其有 3 个 *EcoR* I 的酶切位点,用 *EcoR* I 酶切载体应该能够切出 3 029 bp 和 2 702 bp 两段固定大小的片段和另一条 2.0–2.7 kb 的插入片段。酶切亚克隆质粒图谱正确,送通用生物系统(安徽)有限公司进行测序。

2.2 耐药基因的生物信息学分析

2.2.1 替加环素耐药基因的比对及分析

将返回的基因序列在 National Center for Biotechnology Information (NCBI)网站上进行 BLASTx 分析,结果表明 314-6-11 基因全长 2 453 bp,主要分为一个功能区段,包含全长 1 452 bp (314-1 762 bp)大小的开放阅读框,编码 483 个氨基酸(GenBank 序列号为 ASU06811.1),314-6-11 蛋白与 *Streptomyces* 来源的四环素抗性 MFS 外排泵(WP_018529066.1)相似性高达 89%,推测 314-6-11 基因也为四环素抗性 MFS 外排泵基因,携带该基因的菌株也对四环素产生耐药性,甚至可能对其他四环素类抗生素也产生耐药性。

2.2.2 314-6-11 蛋白的理化性质和二级结构预测

将氨基酸序列输入在线软件 Prot Param 和 Prot Scale 进行蛋白质理化性质的预测和氨基酸序列的

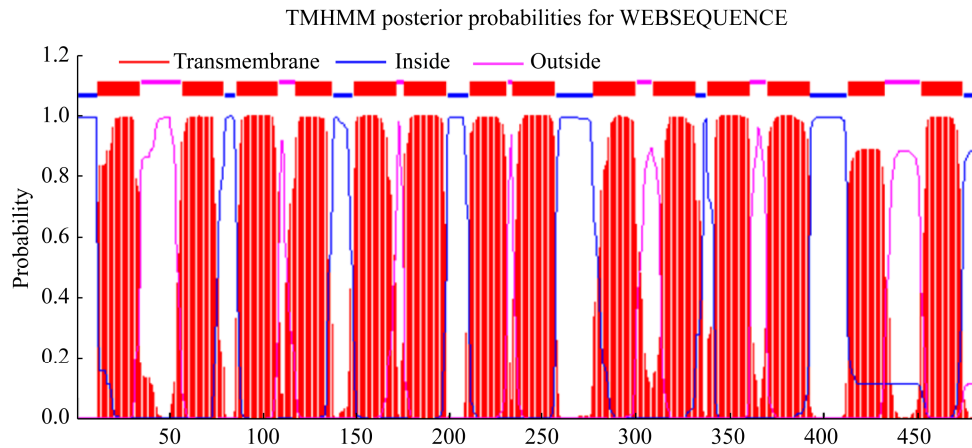


图2 314-6-11 蛋白跨膜区的预测

Figure 2 Predicted transmembrane regions of 314-6-11 protein

注：红色部分：跨膜区域；蓝色部分：细胞膜内区域；粉色部分：位于细胞膜表面；横轴数值：氨基酸个数；竖轴数值：可能性

Note: Red section: transmembrane region; Blue section: intracellular area; Pink section: located on the cell membrane surface; Horizontal axis value: number of amino acids; Vertical axis value: probability

1	<u>MITTAPAPSR</u> TYP SLRAAWI PLAALCLAFF VEMVDNLLS IALPTIGRDL
51	GGGTALQWV TGAYSLTFEG LLTAGSMAD RIGRRRVLLI GLAVFGLLSL
101	CVVAVSTAGE IITLRAGLEI AATAMAPITN SLVFR LFDDQ ALMRAMTLM
151	IVVGMSPFVL GPLLGGTALA HVRNEWLLVV NAPIALIAAI GWFVGVAADR
201	PEDLT KDRLD LPGAALSVVT IGLACYSLTS GVEHGWLSAI TLASVLGAVA
251	AGFAFVRHER RSAAPMLDLS LFSNGTVRGA AIAQVGT SIA MASVMFGLIL
301	HFQYAYGWSP VRAGLANLPI IVTMIAATPL SEWLAKRFGH RVACLVG AAC
351	LAGSLAGLAW GVDHG YAAIA ISMVVMTIGL RTVMTICAIA LVDAMPGNRT
401	SIGTALNDTA QEVGSSVGTAVG TMIAALV TTRL PAGIWT NDLVASFFHG
451	ERVTYAVLAV IVGLIAAGGA LTLTDSHSTE EPH

图3 314-6-11 蛋白保守结构域氨基酸序列

Figure 3 Amino acid sequence of conserved structure from 314-6-11 protein

注：第一行淡紫色部分加下划线区段：motif D1；第二行红色部分加下划线区段：motif A；第三行绿色部分加下划线区段：motif B；第四行粉色部分加下划线区段：motif C；蓝色部分加下划线区段：motif H；第五行黄色部分加下划线区段：motif E；倒数第二行草绿部分加下划线区段：motif F

Note: The lavender part of the first line: motif D1; The red part of the second line: motif A; The green part of the third line: motif B; The pink part of the fourth line: motif C; The blue part: motif H; The yellow part of the fifth line: motif E; The grass green part of the penultimate line: motif F

SAM 依赖性甲基转移酶的 *trm* 基因编码蛋白 (AOR52433.1) 的氨基酸序列；四环素抗性核糖体保护蛋白 Tet (M) (WP_060470565.1) 的氨基酸序列；*rpsJ* 基因编码的核糖体 S10 蛋白 (NP_417780.1) 的氨基酸序列；四环素钝化酶 Tet (X) (M37699.1)

以及其变体 Tet (X3) (MK134375.1)、Tet (X4) (MK134376.1) 和 Tet (X5) (CP040912.1) 的氨基酸序列等。

利用 NCBI 数据库对 314-6-11 蛋白的氨基酸序列与上述所选择的氨基酸序列进行 BLASTp 比对

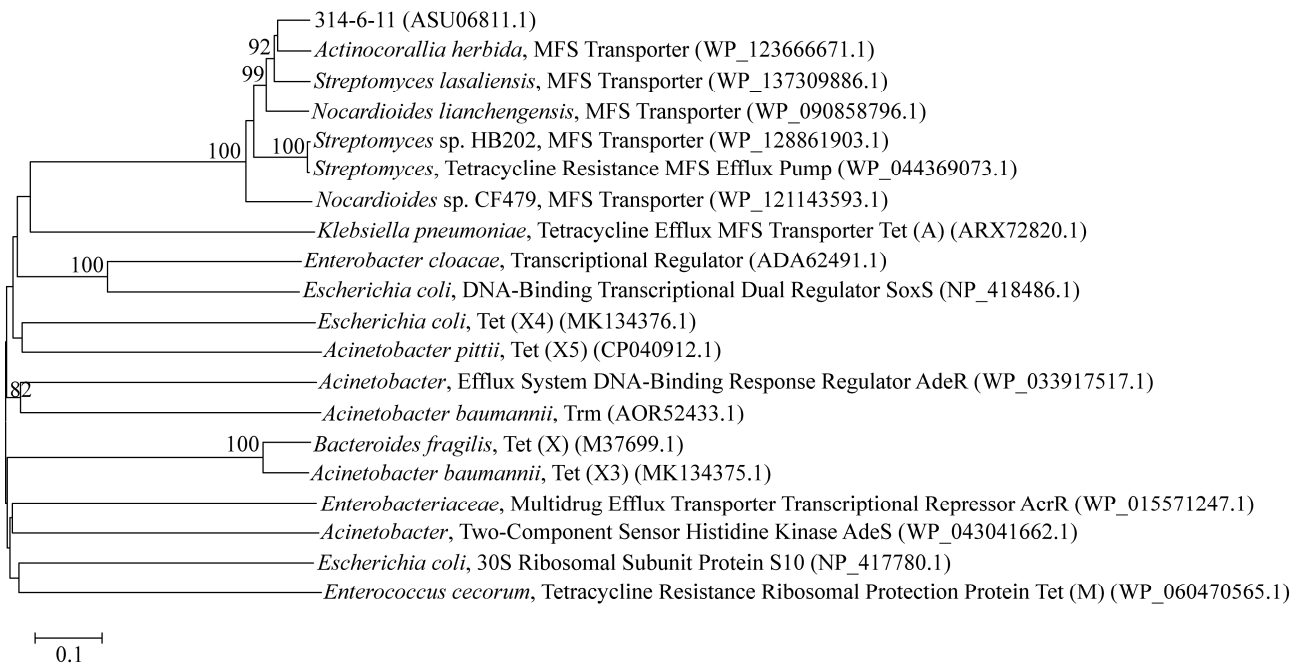


图 4 314-6-11 蛋白及已知替加环素耐药蛋白的氨基酸序列的系统进化树

Figure 4 A phylogenetic tree of the amino acid sequences of 314-6-11 protein and the reported tigecycline resistance protein

注: 分支处数值表示 Bootstrap 值; 括号内表示氨基酸序列在 GenBank 中的登录号; 标尺表示进化距离

Note: Numbers at branch nodes represent bootstrap value; The GenBank accession number of amino acid sequences are shown in the brackets; Bar (0.01) represents sequence divergence

后发现, 314-6-11 蛋白与 *Actinocorallia herbida* 来源的 MFS 转运蛋白的相似性最高, 达到 91.44%, 与 *Streptomyces lasaliensis*、*Nocardiooides lianchengensis*、*Streptomyces* sp. HB202 和 *Nocardiooides* sp. CF479 来源的 MFS 转运蛋白的相似性较高, 分别为 90.4%、88.54%、84.66%和 83.05%, 与 *Streptomyces* 来源的四环素抗性 MFS 外排泵的相似性为 84.66%, 与肺炎克雷伯菌来源 *tetA* 基因编码的蛋白相似性为 55.56%。但是, 314-6-11 蛋白与图 4 所示其他替加环素耐药基因编码蛋白的氨基酸序列的比对结果为“未发现重大相似性(No Significant Similarity Found)”, 而与 AcrAB 外排泵过表达有关的 *ramA* 基因编码蛋白和其全局调节蛋白 SoxS 的相似性为 45%, Tet (X)与 Tet (X3)的相似性为 85.57%, Tet (X3)、Tet (X4)、Tet (X5)之间的相似性为 89.62%–91.78%。AcrAB 外排泵的过

表达会引起肠杆菌科细菌对替加环素产生耐药性, Tet (X)及其变异型也会导致菌株对替加环素产生耐药性, 并且是由不同机制引发的, 但是 314-6-11 蛋白与这些不同的引发替加环素耐药的蛋白相似性较低, 甚至未发现重大相似性。结合图 4 系统进化树分析, 314-6-11 蛋白与 *Actinocorallia herbida*、*Streptomyces lasaliensis*、*Nocardiooides lianchengensis* 来源的 MFS 转运蛋白还有 *Streptomyces* 来源的四环素抗性 MFS 外排泵处于同一分支且相似性较高, 说明 314-6-11 蛋白与大部分 MFS 外排泵的进化距离较近; 与 *Acinetobacter baumannii* 来源的 Tet (X3)、*trm* 编码蛋白以及大肠杆菌来源的 Tet (X4) 等已报道的替加环素耐药基因的编码蛋白处于不同的分支, 进化距离较远, 而且未发现重大相似性。推测某些 MFS 外排泵属于另一类介导替加环素耐药蛋白。

2.3 最低抑菌浓度的测定和外排泵抑制剂的抑制实验

最低抑菌浓度的测定结果如表 1 所示, 根据 EUCAST 的判定结果, 菌株对替加环素的 MIC > 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 判定其对替加环素产生耐药性, 314-6-11 菌株对替加环素的 MIC 高达 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 则其对替加环素产生耐药性。根据美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 文件^[30]的判定结果, 菌株对四环素的 MIC $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ 判定其对四环素产生耐药性, 314-6-11 菌株对四环素的 MIC 为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其对四环素产生耐药性, 所以推测其对四环素类抗生素均产生耐药性。因此特选取第二代四环素——米诺环素与多西环素作为代表药物进行 MIC 的测定。根据 CLSI 文件的判定结果, 菌株对米诺环素或多西环素的 MIC $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$, 判定其对米诺环素或多西环素产生耐药性, 314-6-11 菌株对米诺环素和多西环素的 MIC 为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (< 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 但是与对照菌株对米诺环素和多西环素的 MIC 比较, 若比值 ≥ 4 或以上, 也判定 314-6-11 菌株对米诺环素和多西环素产生耐药性。除此之外, 314-6-11 菌株对环丙沙星、妥布霉素、阿莫西林、庆大霉素、萘啶

酮酸的 MIC 测定结果显示, 314-6-11 菌株对这 5 种抗生素敏感。因此推测携带这个四环素抗性 MFS 外排泵基因的菌株只对四环素类抗生素耐药。

除此之外, 还进行了外排泵抑制剂 CCCP 分别抑制替加环素、多西环素、米诺环素和四环素的实验, 并观察 CCCP 加入前后菌株 MIC 的变化情况, 均做了 2 次重复实验。实验结果如表 1 所示: 当 CCCP 浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 314-6-11 菌株对替加环素、米诺环素、多西环素的 MIC 值降到 1/4, 对四环素的 MIC 值降到 1/4 以下; 当 CCCP 浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 314-6-11 菌株对替加环素、米诺环素、多西环素和四环素的 MIC 值均降到 1/4 以下, 表明 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上浓度的 CCCP 可以抑制外排泵对这几种抗生素的外排作用。

3 讨论与结论

自从在临床上发现替加环素耐药菌以来, 科学家们逐渐开始了对其耐药机制的研究, 研究大多集中在革兰氏阴性菌中, 多见于鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 和肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 细菌。但是细菌对替加环素的耐药机制十分复杂, 至今尚无充足的研究可以阐

表 1 最低抑菌浓度的测定

Table 1 Minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobial agents ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Item	ATCC 25922	<i>E. coli</i> EPI100	pWEB-TNC vector	314-6-11
TGC	0.03–0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	16.0
TGC+CCCP 5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<0.25	<0.25	≤ 0.25	<0.25
TGC+CCCP 4 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<0.25	<0.25	≤ 0.25	4.0
TET	0.5–2.0	2.0	1.0	32.0
TET+CCCP 5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.0	<1.0	1.0	<1.0
TET+CCCP 4 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.0	1.0	1.0	1.0
DOX	0.5–2.0	1.0	2.0	8.0
DOX+CCCP 5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.0	<1.0	1.0	1.0
DOX+CCCP 4 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.0	<1.0	≤ 1.0	2.0
MIN	0.25–1.0	0.5	2.0	8.0
MIN+CCCP 5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.5	<0.5	<0.5	<0.5
MIN+CCCP 4 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.0	0.5	2.0	2.0

注: TGC: Tigecycline; TET: Tetracycline; DOX: Doxycycline; MIN: Minocycline

Note: TGC: Tigecycline; TET: Tetracycline; DOX: Doxycycline; MIN: Minocycline

明, 通过查阅文献, 发现主要有以下 3 类耐药机制: (1) 外排泵的过表达。研究比较多的是 AcrAB 外排泵和 AdeABC 外排泵。AcrAB 外排泵广泛存在于肠杆菌科细菌中, 其受全局调节蛋白 MarA-SoxS-Rob 系统和局部调节蛋白 AcrR 的调控^[31-32], 研究发现其过表达可以导致肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)^[13,33]、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)^[34] 以及其他肠杆菌科细菌如阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 等^[14] 对替加环素耐药。AdeABC 外排泵主要存在于鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 中, 受双组分调节系统 AdeRS 调节^[35], 研究发现, 在 *adeS* 基因前插入序列 ISs 或者是 *adeR* 和 *adeS* 基因的点突变介导替加环素耐药, 会影响 *adeB* 或者 *adeJ* 基因的表达, 进一步导致 *adeABC* 的过表达, 从而使鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 对替加环素耐药^[17,36]。(2) 编码 1-酰基-3-丙三醇磷酸酰基转移酶的 *plsC* 基因^[37]、编码 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 依赖性甲基转移酶的 *trm* 基因^[38]、编码核糖体 S10 蛋白的 *rpsJ* 基因^[21] 也和替加环素耐药有关, 前者在细菌外膜主要成分合成中起着重要作用, 其突变会导致菌株膜通透性的改变, 进而引起替加环素耐药; 后两者的突变会降低细菌对替加环素的敏感性。(3) 近几年还发现了四环素钝化酶 Tet (X)^[22] 及其变异型 Tet (X3)^[23]、Tet (X4)^[23]、Tet (X5)^[24] 介导替加环素的抗性。

本实验室先前构建好的土壤宏基因组文库的采样地点是云南树林土壤, 海拔 2 100 m, 采样处没有抗生素的使用情况, 在这种情况下筛选得到一个对替加环素耐药 (MIC 值 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的亚克隆 314-6-11, 证实了功能宏基因组学技术在挖掘抗生素耐药基因的可行性, 也给近十几年科学家们研究发现的耐药基因起源于土壤^[39-42] 提供借鉴。此前关于大肠埃希菌中替加环素耐药的相关报道并不是很多, 并且在没有抗生素筛选压力的土壤中挖掘替加环素耐药基因的研究更少, 采用功能宏基因组学

方法有助于挖掘土壤中新的抗生素耐药基因和发现新的耐药机制, 有助于在耐药基因传递到临床前给人以预警。

对 314-6-11 基因进行 BLASTx 比对发现, 其编码蛋白属于四环素抗性 MFS 外排泵, 推测 314-6-11 菌株也具有四环素抗性, 对其进行最低抑菌浓度实验发现同时具有四环素、米诺环素、多西环素和替加环素抗性, 但是对其他种类抗生素无抗性, 推测有些四环素抗性 MFS 外排泵只对四环素类抗生素有作用; 接着进一步进行生物信息学分析, 跨膜区结果表明 314-6-11 蛋白含有 14 个跨膜区域, 属于 14 次跨膜螺旋 MFS 外排泵; 系统进化分析表明其与其他介导替加环素耐药基因的编码蛋白亲缘关系较远, 属于另一类介导替加环素耐药的蛋白, 可为替加环素耐药机制的研究提供借鉴; 使用 MFS 外排泵抑制剂 CCCP 抑制外排泵的过表达, 发现当 CCCP 浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时能够降低细菌对四环素类抗生素的 MIC 值, 抑制细菌耐药。

MFS 属于五大主动外排系统中的一大类^[43], 分布广泛, 在细菌、古生菌和真核生物中^[44-45] 均存在, 通常通过膜融合蛋白与外膜蛋白组成三联复合体, 从而形成一个连续的通道, 排出包括抗菌药物在内的各种有毒化合物。膜融合蛋白一般通过一个跨膜域或者一个 N 端脂质组固定在内膜处^[46]。MFS 蛋白多由 400-450 个氨基酸残基组成, 含有 12 个或者 14 个跨膜的 α -螺旋结构, 跨膜区有大量高度保守的氨基酸序列, 这些序列在结构维持和功能发挥上起重要作用^[47]。本研究对 314-6-11 蛋白的保守结构域分析表明其含有典型的 14 次跨膜螺旋 MFS 外排泵保守结构域 A (GxLaDrxGrkxx(x)1)、B (1xxxRxxqGxgaa)、C (gxxxGPxxGGx1)、D1 (1DxTvxnvAIP)、E (DxxGxxL)、F (1gxxxGxavxgx1)、H (WxwxF11NvPig), 括号中表示的是保守结构域序列, 大写字母表示的是出现在 70% 以上比对序列的氨基酸, 小写字母表示的是出现在 40% 左右比对序列的氨基酸, 小写字母

x 表示任意氨基酸, (x)表示的是不常见的氨基酸。其中, 保守结构域 A 位于第 2 跨膜结构和第 3 跨膜结构之间, 含有 β -turn 结构, 可能与运输通道的开启和关闭所需的可逆构象变化有关; 保守结构域 B 位于第 4 跨膜结构, 可能与质子转移有关。此外, 在多重耐药转运蛋白以及特殊的药物外排泵中均发现的保守结构域 C 处在第 5 跨膜结构, 可能决定了药物运输的方向; 保守结构域 F 位于 C 端, 含有保守结构域 C 的重复序列, 推测其功能可能与保守结构域 C 类似^[28,48-50], 这些保守结构域的存在给带电荷药物的结合、运输以及质子转移带来了巨大好处。要想更准确地了解 314-6-11 蛋白的功能机制需要进行结构生物学分析, 但是由于膜转运蛋白处于高度运动状态, 加上现有实验条件的限制, 科学家们只获得了极少数 MFS 蛋白成员的晶体结构^[51], 而且绝大多数分辨率都较低, 要想深入了解转运机制和功能需要获得分辨率更高的结构, 这成为了研究的难点和热点。

REFERENCES

- [1] Meng FH, Li ZL. Medicinal Chemistry[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2016: 272 (in Chinese)
孟繁浩, 李柱来. 药物化学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016: 272
- [2] Tang KY, Wang X, Xiao XM. Clinical characteristics of multidrug-resistant bacteria infection and its prevention and control strategy[J]. Contemporary Medicine, 2019, 25(2): 61-63 (in Chinese)
唐科毅, 王璇, 肖向梅. 多重耐药菌感染的临床特点分析与防控策略[J]. 当代医学, 2019, 25(2): 61-63
- [3] Li JX, Gong YW. Analysis of multidrug-resistant strain hospital infections[J]. Laboratory Medicine, 2013, 28(9): 784-788 (in Chinese)
李继霞, 公衍文. 多重耐药菌医院感染状况分析[J]. 检验医学, 2013, 28(9): 784-788
- [4] Zhong X, Chen DK, Xu HT, Cheng G, Hu X. New advance in the study of tigecycline[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2015, 40(11): 870-875 (in Chinese)
钟雪, 陈东科, 许宏涛, 程刚, 胡欣. 替加环素研究新进展[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(11): 870-875
- [5] Someya Y, Yamaguchi A, Sawai T. A novel glycylicycline, 9-(N,N-dimethylglycylamido)-6-demethyl-6-deoxytetracycline, is neither transported nor recognized by the transposon Tn10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995, 39(1): 247-249
- [6] Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. RamA, a transcriptional regulator, and AcrAB, an RND-type efflux pump, are associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Enterobacter cloacae*[J]. Microbial Drug Resistance, 2007, 13(1): 1-6
- [7] Tasina E, Haidich AB, Kokkali S, Arvanitidou M. Efficacy and safety of tigecycline for the treatment of infectious diseases: a meta-analysis[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2011, 11(11): 834-844
- [8] Sun GF, Chen D, Sun Z. Progress in the research of tigecycline, a new generation of antibacterials[J]. Drug Evaluation, 2014, 11(12): 21-27 (in Chinese)
孙桂凤, 陈颀, 孙钊. 新一代抗菌药物替加环素的研究进展[J]. 药品评价, 2014, 11(12): 21-27
- [9] Peleg AY, Potoski BA, Rea R, Adams J, Sethi J, Capitano B, Husain S, Kwak EJ, Bhat SV, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection while receiving tigecycline: a cautionary report[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 59(1): 128-131
- [10] Anthony KB, Fishman NO, Linkin DR, Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E. Clinical and microbiological outcomes of serious infections with multidrug-resistant gram-negative organisms treated with tigecycline[J]. Clinical Infectious Diseases, 2008, 46(4): 567-570
- [11] Daurel C, Fiant AL, Brémont S, Courvalin P, Leclercq R. Emergence of an *Enterobacter hormaechei* strain with reduced susceptibility to tigecycline under tigecycline therapy[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(11): 4953-4954
- [12] Spanu T, De Angelis G, Cipriani M, Pedruzzi B, D'Inzeo T, Cataldo MA, Sganga G, Tacconelli E. *In vivo* emergence of tigecycline resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(8): 4516-4518
- [13] Zhong X, Xu HT, Chen DK, Zhou HJ, Hu X, Cheng G. First emergence of *acrAB* and *oqxAB* mediated tigecycline resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* pre-dating the use of tigecycline in a Chinese hospital[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115185
- [14] Veleba M, De Majumdar S, Hornsey M, Woodford N, Schneiders T. Genetic characterization of tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(5): 1011-1018
- [15] Chiu SK, Huang LY, Chen H, Tsai YK, Liou CH, Lin JC, Siu LK, Chang FY, Yeh KM. Roles of *ramR* and *tet(A)* mutations in conferring tigecycline resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(8): e00391-17

- [16] Yoon EJ, Chabane YN, Goussard S, Snesrud E, Courvalin P, Dé E, Grillot-Courvalin C. Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*[J]. *mBio*, 2015, 6(2): e00307-15
- [17] Gerson S, Nowak J, Zander E, Ertel J, Wen YR, Krut O, Seifert H, Higgins PG. Diversity of mutations in regulatory genes of resistance-nodulation-cell division efflux pumps in association with tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, 73(6): 1501-1508
- [18] Veleba M, Schneiders T. Tigecycline resistance can occur independently of the *ramA* gene in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(8): 4466-4467
- [19] Hirata T, Saito A, Nishino K, Tamura N, Yamaguchi A. Effects of efflux transporter genes on susceptibility of *Escherichia coli* to tigecycline (GAR-936)[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(6): 2179-2184
- [20] Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Hudson S, Livermore DM, Woodford N. Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and ceftiofloxime[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(3): 479-482
- [21] Beabout K, Hammerstrom TG, Perez AM, Magalhães BF, Prater AG, Clements TP, Arias CA, Saxer G, Shamoo Y. The ribosomal S10 protein is a general target for decreased tigecycline susceptibility[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(9): 5561-5566
- [22] Linkevicius M, Sandegren L, Andersson DI. Potential of tetracycline resistance proteins to evolve tigecycline resistance[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(2): 789-796
- [23] He T, Wang R, Liu DJ, Walsh TR, Zhang R, Lv Y, Ke YB, Ji QJ, Wei RC, Liu ZH, et al. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(9): 1450-1456
- [24] Wang LY, Liu DJ, Lv Y, Cui LQ, Li Y, Li TM, Song HW, Hao YX, Shen JZ, Wang Y, et al. Novel plasmid-mediated *tet(X5)* gene conferring resistance to tigecycline, eravacycline, and omadacycline in a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019, 64(1): e01326-19
- [25] Gu XQ, Wang SL, Wang SC, Zhao LX, Cao MM, Feng ZY. Identification and characterization of two novel esterases from a metagenomic library[J]. *Food Science and Technology Research*, 2015, 21(5): 649-657
- [26] Putman M, Van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(4): 672-693
- [27] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019
- [28] Wang TH, Ling BD. Research on the expression of the efflux pump gene *adeB* in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and related to multidrug resistance[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2013, 38(11): 859-862 (in Chinese)
王同慧, 凌保东. 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌 *adeB* 外排泵基因表达与多重耐药相关的研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(11): 859-862
- [29] Skolnick J, Fetrow JS. From genes to protein structure and function: novel applications of computational approaches in the genomic era[J]. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(1): 34-39
- [30] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014
- [31] Hobbs EC, Yin XF, Paul BJ, Astarita JL, Storz G. Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(41): 16696-16701
- [32] Yu LL, Lu W, Ye C, Wang ZS, Zhong M, Chai Q, Sheetz M, Wei YN. Role of a conserved residue R780 in *Escherichia coli* multidrug transporter AcrB[J]. *Biochemistry*, 2013, 52(39): 6790-6796
- [33] Bratu S, Landman D, George A, Salvani J, Quale J. Correlation of the expression of *acrB* and the regulatory genes *marA*, *soxS* and *ramA* with antimicrobial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* endemic to New York City[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 64(2): 278-283
- [34] Keeney D, Ruzin A, McAleese F, Murphy E, Bradford PA. MarA-mediated overexpression of the AcrAB efflux pump results in decreased susceptibility to tigecycline in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 61(1): 46-53
- [35] Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(9): 3298-3304
- [36] Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Thomas CP, Gordon NC, Wareham DW, Quinn J, Lolans K, Livermore DM, Woodford N. AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(8): 1589-1593
- [37] Li X, Liu L, Ji J, Chen Q, Hua X, Jiang Y, Feng Y, Yu Y. Tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii* mediated by frameshift mutation in *plsC*, encoding

- 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2015, 34(3): 625-631
- [38] Chen Q, Li X, Zhou H, Jiang Y, Chen Y, Hua XT, Yu YS. Decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii* mediated by a mutation in *trm* encoding SAM-dependent methyltransferase[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, 69(1): 72-76
- [39] D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, et al. Antibiotic resistance is ancient[J]. *Nature*, 2011, 477(7365): 457-461
- [40] Dantas G, Sommer MOA, Oluwasegun RD, Church GM. Bacteria subsisting on antibiotics[J]. *Science*, 2008, 320(5872): 100-103
- [41] Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MOA, Dantas G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens[J]. *Science*, 2012, 337(6098): 1107-1111
- [42] Sun JT, Zeng QT, Tsang DCW, Zhu LZ, Li XD. Antibiotics in the agricultural soils from the Yangtze River Delta, China[J]. *Chemosphere*, 2017, 189: 301-308
- [43] Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(20): 5803-5812
- [44] Pao SS, Paulsen IT, Saier Jr MH. Major facilitator superfamily[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(1): 1-34
- [45] Saier MH, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WHM, Huang SC, Jack DL, Jähn PS, Lew K, Liu J, et al. The major facilitator superfamily[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1999, 1(2): 257-279
- [46] Tanabe M, Szakonyi G, Brown KA, Henderson PJF, Nield J, Byrne B. The multidrug resistance efflux complex, EmrAB from *Escherichia coli* forms a dimer *in vitro*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 380(2): 338-342
- [47] Saier Jr MH, Paulsen IT, Sliwinski MK, Pao SS, Skurray RA, Nikaido H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria[J]. *The FASEB Journal*, 1998, 12(3): 265-274
- [48] Griffith JK, Baker ME, Rouch DA, Page MGP, Skurray RA, Paulsen IT, Chater KF, Baldwin SA, Henderson PJF. Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1992, 4(4): 684-695
- [49] Jessen-Marshall AE, Paul NJ, Brooker RJ. The conserved motif, GXXX(D/E)(R/K)XG[X](R/K)(R/K), in hydrophilic loop 2/3 of the lactose permease[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(27): 16251-16257
- [50] Paulsen IT, Skurray RA. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes: an analysis[J]. *Gene*, 1993, 124(1): 1-11
- [51] Deng D, Yan N. Structural basis and transport mechanism of the major facility superfamily (MFS) transporter[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2015, 60(8): 720-728 (in Chinese)
邓东, 颜宁. MFS 超家族转运蛋白结构基础及转运机制[J]. *科学通报*, 2015, 60(8): 720-728