

ToIC表达量与大肠埃希菌 K-12耐四环素的研究

张丹凤 黄传钟 王三英*

(厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

摘要: 随着抗生素的开发与使用,细菌在对多种抗生素的适应过程中逐渐发展出对抗生素耐药的反应机制。ToIC是药物排出转运体系的外膜成分,与AcrAB一起形成主要的药物排出泵,有关其表达量与耐药间的关系目前尚不清楚。试验将*toIC*克隆到pET-32a载体上进行诱导表达,镍柱纯化,免疫新西兰大白兔,获得1:4000的抗血清。Western blotting分析表明,ToIC的表达量在耐四环素的大肠埃希菌K-12中比对照组提高50%。细菌ToIC高表达试验发现,其MIC从100 μ g/ml提高到200 μ g/ml。结果说明ToIC的表达量与四环素耐药性直接相关,提示细菌可以通过调节外膜蛋白的表达实现对抗生素的耐受。

关键词: ToIC; 耐药性; 大肠埃希菌 K-12 四环素

中图分类号: R378.21 文献标识码: A

Association of ToIC expression with resistance to tetracycline in *Escherichia coli* K-12

Zhang Dan-feng Huang Chuan-zhong and Wang San-ying

(The School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

ABSTRACT Association of ToIC expression with resistance to tetracycline in *Escherichia coli* K-12 was studied. ToIC was an outer membrane protein, which was bound with AcrAB to form a critical multidrug efflux pump. However, association of ToIC amount with drug resistance was ill-defined. In the study, *toIC* was cloned into pET-32a vector induced expression and its recombinant proteins were purified by Ni-NTA. The purified recombinant proteins were used for preparing of anti-ToIC. The prepared antiserum with titer 1:4000 was utilized as the primary antibody in Western blotting. It showed that ToIC amount was increased 50% in tetracycline-resistant *E. coli* K-12 compared to its original control strain. When ToIC was overexpressed, the strain showed strong resistance to tetracycline with its MIC from 100 μ g/ml to 200 μ g/ml. These findings indicated that ToIC amount was directly correlated to bacterial resistance to tetracycline, suggesting that bacteria mounted an adaptive feedback to antibiotics by regulating outer membrane protein expression.

KEY WORDS ToIC; Drug resistance; *E. coli* K-12; Tetracycline

随着人们对抗生素的过分依赖和滥用,耐药菌株迅猛发展,对人类健康构成严重的威胁。四环素通过与核糖体的30S亚单位结合以抑制细菌蛋白合成^[1]而成为广谱抗生素,其抗菌谱包括许多革兰阳性和阴性菌、立克次体、支原体、衣原体、放线菌等。在20世纪50年代,细菌对四环素都非常敏感;1953年Flakow等^[2]首次发现痢疾志贺菌*S. dysenteriae*对四环素产生耐药性,后来又发现志贺菌属*Shigella*对四环素、氯霉素和链霉素产生了多重耐药性^[2-4]。目前认为,细菌耐四环

素机制可以分成以下三类:①产生相应的水解及修饰酶以破坏药物活性;②改变药物靶点的结构,使药物无法识别;③阻止药物与靶点接触,其中包括调节膜通透性以及药物排出转运体系的作用,而这两者都与外膜蛋白的作用紧密相关^[5]。药物排出转运体系是当前细菌耐药性研究关注的热点,如大肠埃希菌中的AcrAB-ToIC系统^[6]和铜绿假单胞菌中的MexAB-OprM系统^[7]等。药物排出转运体系是对抗生素开发及应用的一个挑战,深入研究其机制将有助于我们发现

收稿日期: 2007-01-29 修回日期: 2007-07-23

作者简介: 张丹凤,女,生于1979年,在读博士研究生。

* 通讯作者, E-mail: wangpen@xm.u.edu.cn

新的抗菌机制,找到新的靶点。AcrAB-TolC排出系统是大肠埃希菌的主要多重药物外排系统,由内膜转运体AcrB周质融合蛋白AcrA和外膜通道蛋白TolC组成^[6]。Xu等^[8]报道,在耐四环素大肠埃希菌K-12中,TolC的表达量上调。Cristobal等^[9]发现,大肠埃希菌tolC突变株对四环素的耐药性相对于对照大肠埃希菌下降了5~6倍;当AcrAB转运体系缺失,对四环素的耐药性与tolC突变株一样,MIC值均下降。这些研究表明,AcrAB-TolC排出系统在大肠埃希菌对四环素耐药性中的重要性,目前有关TolC表达量与耐药间的关系尚不清楚。鉴于从蛋白质水平更能直接反映有关生物学意义,本研究探讨TolC在模式菌大肠埃希菌K-12耐四环素中的作用和意义,旨在深入研究AcrAB-TolC药物排出转运系统的作用机制,促进新型抗菌药物的研发。

1 实验材料与方法

1.1 菌株及质粒来源

大肠埃希菌K-12购自中国科学院微生物研究所,大肠埃希菌工程菌株为大肠埃希菌DH5 α 和BL21(DE3)为本实验室保存菌株;质粒载体pET-32a为本实验室保存质粒。

1.2 tolC的克隆

tolC的引物根据NCBI上大肠埃希菌K-12的基因组序列设计,并在引物的两端引入酶切位点,P1 5'-CGAGAATTCATGCAAATGAAGAAA-3'; P2 5'-GGTCTCGAGTCAGTTACGGAA-AGGG-3'。PCR扩增后,产物进行胶回收,回收产物与pET-32a质粒均用EcoRI与XhoI进行双酶切,回收、连接和转化,筛选含有目的基因的克隆子。

1.3 TolC的诱导表达与纯化

将含有目的基因的克隆子转化大肠埃希菌BL21,对照菌和重组菌分别挑取单菌落接种于3ml含100 μ g/ml氨苄西林的LB培养基中,于37 $^{\circ}$ C培养至A₆₀₀约0.5,加入IPTG至终浓度为1mmol/L,37 $^{\circ}$ C继续培养3h,SDS-PAGE电泳检测。大量接种300ml菌液进行诱导表达,并根据Novagen公司Ni-NTA试剂盒说明书操作步骤进行纯化,洗脱样品于-20 $^{\circ}$ C保存。

1.4 MALDI-TOF MS鉴定

按照Xu等^[8]的方法进行样品处理,使用德国Bruker公司的ReflexTM III MALDI-TOF质谱仪进行分析,反射模式,离子源加速电压1为20kV,加速电压2为23kV,N₂激光波长337nm,脉冲宽度为3ns,离子延迟提取200ns,真空度1 \times 10⁻⁷Torr,质谱信号单次扫描累加50次,并用标准Maker峰作为外标校

正质谱峰,正离子谱测定,获得肽质量指纹图谱。

1.5 兔抗血清的制备

根据Peng等^[10]报道的方法免疫新西兰大白兔,采血,摆成最大斜面后在4 $^{\circ}$ C冰箱中静置过夜,使血清自然析出,分装血清,-80 $^{\circ}$ C保存。用DOT-ELISA方法测定血清的效价。

1.6 耐四环素大肠埃希菌K12的筛选

按两倍稀释法^[11]测定测定大肠埃希菌K12(原代,C0)对四环素的MIC值(MIC₀),然后在次抑菌浓度条件下(0.5MIC)对大肠埃希菌进行传代培养,每隔12h传代1次,共传代10次,在MH培养基测定其(T₁₀)的MIC值(MIC₁₀)。如果MIC₁₀/MIC₀>4则说明此菌株对该抗生素表现出耐药性。

1.7 膜蛋白提取

按照Sabri等^[12]的方法提取膜蛋白。挑取单菌落接种于培养基中,振荡培养过夜。以此为种子菌,按1:50(V/V)的比例接种于另一批培养基中,振荡培养至A₆₀₀=1.0,6000g收集菌体,用生理盐水洗涤菌体2次。称菌体湿重,按1:5(W/V)的比例加入超声波破碎缓冲液悬浮菌体,超声破碎,输出功率50%,每次71s,间隔99s,超声15min。超声破碎后的菌液,12000g,4 $^{\circ}$ C离心15min,收集上清。上清液100000g,4 $^{\circ}$ C离心40min,弃上清,沉淀溶于一定体积超声缓冲液中。样品分装,-80 $^{\circ}$ C保存。

1.8 Western blotting分析

按照常规的方法^[13]进行SDS-PAGE,电泳结束后,进行电转,恒压50V电转2h,丽春红染色检测电转的效果;加封闭液封闭,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;加入一抗,室温孵育1h,取出NC膜,TNT洗膜3次,每次10min;加入酶标二抗,室温孵育1h;取出NC膜,TNT洗膜3次,每次10min;DAB显色。

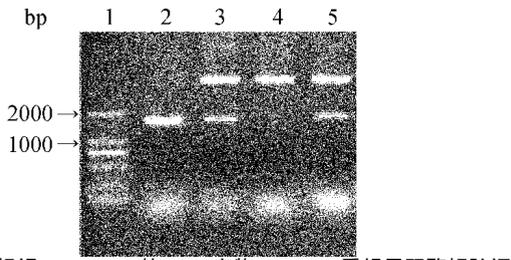
1.9 高表达分析

依1.3步骤诱导tolC-pET-32a/BL21与pET-32a/BL21菌株,并提取它们的膜蛋白,进行SDS-PAGE分析。按两倍稀释法,测定能够大量表达TolC到膜蛋白中的菌株与对照菌株的MIC值。

2 结果与分析

2.1 tolC克隆与载体构建

以大肠埃希菌K-12全基因组DNA为模板,进行PCR扩增,图1第2泳道示PCR扩增得到单一特异条带,而且片段的分子量大小与预计的相当。将tolC重组到pET-32a载体上,挑取重组克隆子,提取质粒并进行双酶切验证。结果表明,阳性克隆子酶切得到的目的片段与以大肠埃希菌K-12菌体作为模板的阳性



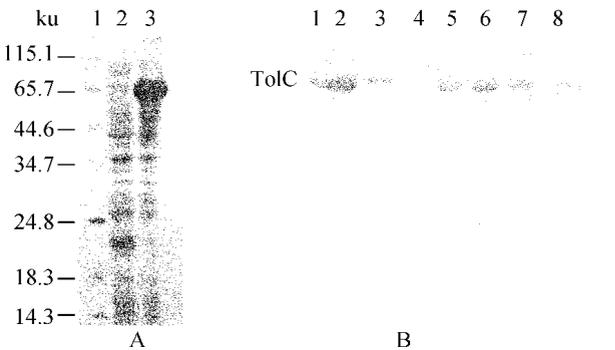
1 分子量标记; 2 *toIC* 的 PCR 产物; 3-5 重组子双酶切验证
图 1 *toIC* PCR 产物与重组子双酶切验证

对照大小一致(图 1)。

2.2 *ToIC* 的原核表达与纯化

图 2A 示 pET-32a-*toIC* 重组子经 IPTG 诱导表达后的全菌蛋白 SDS/PAGE 分析, 可见 pET-32a-*toIC*/BL21 经诱导表达后, *ToIC* 蛋白加上融合蛋白大小约 72.4ku 左右, 扣除 20.2ku 的载体融合蛋白, 约为 52.6ku 左右, 与预计的分子量相符。进一步用镍柱纯化重组 *ToIC*, 结果如图 2B 所示。从图 2 可见, 重组 *ToIC* 为单一的目的蛋白带, 获得的目的蛋白较纯。

切取目的蛋白带, 采用 MALDI-TOF 进行鉴定。质谱结果如图 3 及表 1 所示, 证明镍柱纯化的蛋白确为 *ToIC*。将其作为抗原, 用于兔抗 *ToIC* 抗血清的制备。结果表明, 所制备的兔抗 *ToIC* 抗血清的效价为 1:4000。



A: 全菌蛋白 SDS/PAGE 分析, 1 分子量另标记; 2 pET-32a/BL21
3 *toIC*-pET-32a/BL21
B 镍柱纯化图, 1-8 镍柱纯化的重组 *ToIC*

图 2 *toIC*-pET-32a/BL21 原核表达与纯化

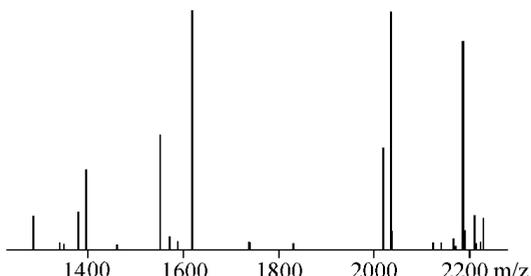


图 3 镍柱纯化目的蛋白的 PMF 图谱

表 1 镍柱纯化目的蛋白的 PMF 鉴定

蛋白性质	亚细胞定位	匹配数目	分子量	得分
TOIC-ECOLI	Omp	10	53708	89

2.3 四环素耐药菌株膜蛋白提取与 Western blotting 验证

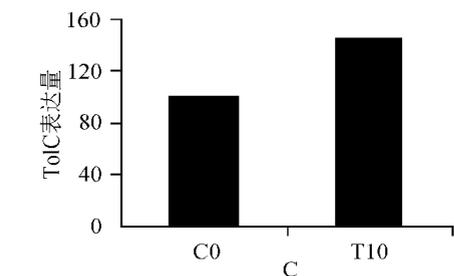
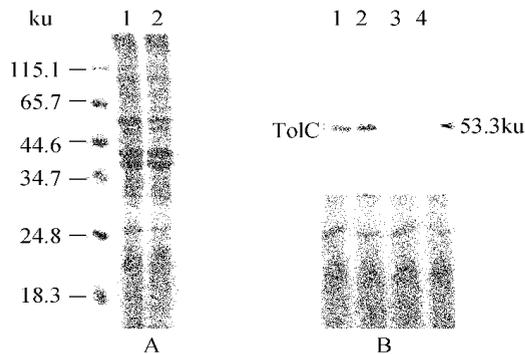
大肠埃希菌 K-12(C0)对四环素的 MIC₀ 值为 6.25 μg/ml, 在次抑菌浓度条件下 (1/2 MIC) 传代 10 次, 测定其 (T10) 对四环素的 MIC₁₀ 值为 25 μg/ml, MIC₁₀/MIC₀ 为 4 倍, 提示 T10 具有耐药性。

分别提取了 T10 和 C0 两株菌的膜蛋白, Bradford 法确定两者的上样量均为 10 μg 以免抗 *ToIC* 抗血清为一抗, HRP-羊抗兔为二抗进行 Western blotting 分析, 结果见图 4。图 4A 为这 2 种菌株膜蛋白的 SDS/PAGE 分析, 相互间无明显差别; 图 4B 为其膜蛋白的 Western blotting 分析。该胶上半部分用于 Western blotting 分析, 下半部分采用考马斯亮蓝染色用于加样量对照。由于免疫用的重组 *ToIC* 蛋白没有切除融合蛋白部分, 因此制备的抗 *ToIC* 抗血清中包括抗 *ToIC* 和抗融合蛋白 2 种抗体。为排除由抗融合蛋白导致的非特异性反应, 试验分别采用抗 *ToIC* 抗血清和实验室已有的抗融合蛋白抗血清为一抗进行 Western blotting 分析。结果发现, 只有使用抗 *ToIC* 抗血清为一抗才能在 *ToIC* 相应位置检出阳性带, 且 T10 的 *ToIC* 表达量明显高于 C0。图 4C 为图 4B 以 C0 对照组为 100% 标化后的结果。这些结果说明, *ToIC* 在大肠埃希菌 K-12 耐受四环素过程中起到重要的作用。

2.4 *ToIC* 高表达与细菌耐四环素的关系

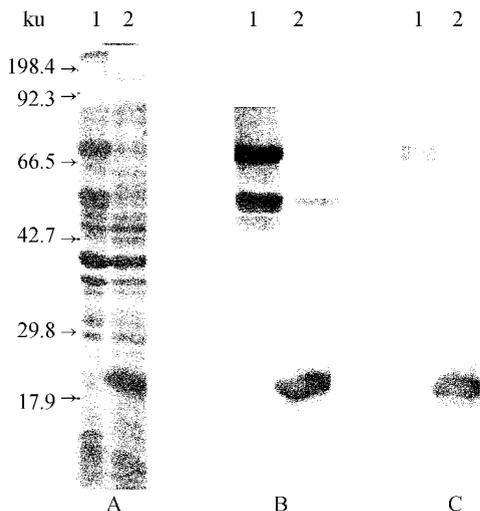
为进一步探讨 *ToIC* 表达量与耐药的关系, 试验构建了 *toIC*-pET-32a 表达质粒, 并以 pET-32a 作对照, 分别在 *E. coli* BL21 中表达。为了证明重组 *ToIC* 已在细胞膜上得到大量表达, 我们提取了膜蛋白进行验证。图 5A 示两者膜蛋白的 SDS/PAGE 分析图谱, 可见相互间具有明显差异。采用抗 *ToIC* 和抗融合蛋白 2 种抗血清进行 Western blotting 试验发现, 试验组出现了 2 条显色带, 分别与天然 *ToIC* 和重组 *ToIC* 的分子量一致(图 5B); 对照组出现 2 条带, 其分子量分别与重组 *ToIC* 和融合蛋白一致(图 5C)。这些结果与我们所使用的 2 种抗血清和被检测对象的特点具有一致性, 说明重组 *ToIC* 确实在试验组细胞膜上得到高表达。

按照 1.6 的方法测定这 2 株菌株对四环素的 MIC 值, 结果如表 2。从表 2 可见, *toIC*-pET-32a/BL21



A: SDS/PAGE电泳图谱, 1 C0 2 T10
 B Western blotting分析, 1 2 依次为 C0与 T10以抗 T_oC 抗血清为一抗; 3 4 依次为 C0与 T10以抗融合蛋白抗血清为一抗;
 C: 图 B的 Phoretix 1D分析

图 4 T10与 C0膜蛋白中 T_oC表达量的 Western blotting分析



A: 膜蛋白 SDS/PAGE图, 1 pET-32a/BL21 2 tolC-pET-32a/BL21
 B 以抗 T_oC 抗血清为一抗的 Western blotting分析, 1 tolC-pET-32a/BL21 2 pET-32a/BL21
 C: 以抗融合蛋白抗血清为一抗的 Western blotting分析, 1 tolC-pET-32a/BL21 2 pET-32a/BL21

图 5 tolC-pET-32a/BL21和 pET-32a/BL21膜蛋白的 SDS/PAGE与 Western blotting分析

表 2 T_oC 高表达与细菌对四环素耐药性的关系

四环素浓度 (μg/ml)	1	5	6	12	25	50	100	200
pET-32a/BL21	+	+	+	+	+	+	+	+
tolC-pET-32a/BL21	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : 表示在该四环素浓度下细菌可以生长

的 MIC 值为 200 μg/ml pET-32a/BL21的 MIC 值为 100 μg/ml 前者是后者的 2倍。

3 讨论

抗生素的生产与发展伴随着细菌耐药性的不断发展, 一种新的抗生素投入使用后, 很快就发现有相应的耐药菌株出现。在细菌中普遍存在的抗性是对抗菌药物的生产开发及对细菌性疾病防治的一个巨大挑战, 对细菌耐药机制的深入研究是解决这一难题的关键。现已证实, 细菌阻止药物与靶位点接触主要通过外膜蛋白对膜通透性的调节以及药物排出转运体系的作用来实现^[5]。根据作用对象的范围, 可以将药物排出转运体系划分为特异性排出转运体系和多种药物排出转运体系这两大类, 后者与现在广泛存在多重耐药菌株有着紧密的关系。不管是特异性还是多药物排出转运体系, 外膜蛋白都在其中起到重要的作用。

大肠埃希菌 AcrAB-T_oC 药物排出转运体系中, T_oC 由 495 个氨基酸组成, 经质谱鉴定分子量为 53.3 ku Woronakis 等^[14]报道, T_oC 为三聚体, 上端空间为 β 折叠, 形成开放结构, 以便给外排药物提供泵出宽阔通道; 下端空间为 α 螺旋, α 螺旋部分进入周质与融合蛋白 AcrA 连接; 当内膜转运蛋白 AcrB 捕获到细胞内的抗生素并与其结合时, T_oC 与 AcrAB 复合体连接, 打开内在通道, 将抗生素排出。因此, 我们对 T_oC 基因进行克隆, 并进行 Western blotting 分析, 显示 T_oC 在耐四环素大肠埃希菌中表达量为上升。上述结果说明 T_oC 表达上调时可以增加细菌对四环素的外排速度, 产生耐药。为了进一步验证 T_oC 的功能我们对 T_oC 进行了高表达分析。试验结果表明, 当 T_oC 大量表达达到膜蛋白上, tolC-pET-32a/BL21 对四环素的耐受由对照的 100 μg/ml 上升到 200 μg/ml 即 T_oC 大量表达可以提高细菌对四环素的耐受能力, 同进也说明大肠埃希菌耐药的产生与 AcrAB-T_oC 系统的功能加强明显相关。我们的结果从蛋白质水平证明了 T_oC 在耐四环素中的重要作用。(下转第 S1 页)

- 30(9): 555- 558
- [8] 张婴元, 朱德妹, 胡付品, 等. 1990- 2004年上海地区临床分离大肠埃希菌耐药性变迁 [J]. 中华医学杂志, 2006 86 (1): 12- 16
- [9] Patterson J E. Extended spectrum beta-lactamases: a therapeutic dilemma [J]. *Pediatr Infect Dis* 2002 21 (10): 957- 959
- [10] Shaw K J, Rather P N, Hare R S, *et al*. Molecular genetics of an inoglycoside resistance genes and familial relationships of the anoglycoside-modifying enzymes [J]. *Microbiol Rev*, 1993 57(1): 138- 163
- [11] 孔海深, 李雪芬, 王菊芳, 等. 大肠埃希菌氨基糖苷酰基转移酶基因型研究 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2006 35 (1): 83- 86
- [12] Hall R M, Collis C M, Kim M J, *et al*. Mobile gene cassettes and integrons in evolution [J]. *Ann N Y Acad Sci* 1999, 870 68- 80
- [13] Poirel L, Le Thomas I, Naas T, *et al*. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase and the class 1 integron. In 52 from *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000 44(3): 622- 632
- [14] Kotra L P, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000 44(12): 3249- 3256

(上接第 700页)

参 考 文 献

- [1] Chopra I, Hawkey P M, Hinton M. Tetracyclines: molecular and clinical aspects [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1992 29(3): 245- 277.
- [2] Flakow S. Infectious multiple drug resistance [M]. Pion Limited, London, 1975: 81- 82
- [3] Akiba T, Koyana K, Ishiki Y, *et al*. On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella* [J]. *Jpn J Microbiol* 1960 4(4): 219- 227
- [4] Watanabe T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria [J]. *Bacteriol Rev*, 1963 27(1): 87- 115.
- [5] McDermott P F, Walker R D, White D G. Antimicrobials: models of action and mechanisms of resistance [J]. *Int J Toxicol* 2003 22(2): 135- 143
- [6] Fralick J A. Evidence that T0C is required for functioning of the MarA-crAB efflux pump of *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol* 1996 178(19): 5803- 5805.
- [7] Yoshida K, Nakayama K, Kuru N, *et al*. MexAB-OpM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 5. Carbon-substituted analogues at the C-2 position [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006 14(6): 1993- 2004
- [8] Xu C X, Lin X M, Ren H X, *et al*. Analysis of outer membrane protein of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline [J]. *Proteomics* 2006, 6(2): 462- 473.
- [9] Cristobal R E, Vincent P A, Salomon R A. Multidrug resistance pump AcrAB-T0C is required for high-level Tet(A)-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006 58(1): 31- 36
- [10] Peng X X, Zhang J Y, Wang S Y, *et al*. Immuno-capture PCR for Detection of *Aeromonas hydrophila* [J]. *J Microbiol Methods* 2002 49(3): 335- 335
- [11] 苏林光, 贾杰, 潘光华. 次抑菌浓度的药物诱导细菌耐药与交叉耐药 [J]. 中国抗生素杂志, 1997 22(4): 301- 303.
- [12] Sabri M Y, Zamri-Saad M, Mutalib A R, *et al*. Efficacy of an outer membrane protein of *Pasteurella haemolytica* A2 A7 or A9-enriched vaccine against intratracheal challenge exposure in sheep [J]. *Vet Microbiol* 2000 73 (1): 13- 23
- [13] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970 227(5259): 680- 685
- [14] Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, *et al*. Crystal structure of the bacterial membrane protein T0C: central to multidrug efflux and protein export [J]. *Nature*, 2000 405(6789): 914- 917