

鸡源大肠杆菌 TEM-57 型 β -内酰胺酶基因的原核表达及酶特性

吴 华¹, 刘保光^{1,2}, 潘玉善¹, 胡功政^{1*}, 苑 丽¹, 刘建华¹ (1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 西藏职业技术学院 畜牧兽医系, 西藏 拉萨 850030)

摘要: 对该临床菌株进行接合试验, 采用 PCR 扩增获得 bla_{TEM-57} 基因片段, 定向克隆入表达载体 pET-28a 构建重组质粒, 经酶切和 DNA 测序鉴定后进行诱导表达, 用双紫外分光光度仪测定表达蛋白的底物水解特性和抑制剂的抑制特性。结果显示, 耐药质粒成功从供体菌接合转移到大肠杆菌 C600, 接合子对青霉素类及氨基糖苷类药物耐药。PCR 扩增产物电泳出现 bla_{TEM-57} 目的条带。重组质粒经 EcoR I、XhoI I 双酶切及测序鉴定后, 显示 pET-28a/TEM-57 原核表达载体构建成功。原核表达的最优条件为 IPTG 浓度 0.8 mmol/L、温度 37℃、诱导时间 4 h。bla_{TEM-57} 能水解氨苄西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢噻唑钠、头孢曲松钠、头孢噻肟钠及头孢哌酮, 对头孢氨苄的 K_m 最小为 2.4, 对头孢噻唑钠的 K_m 最大为 121.5; 抑制剂舒巴坦钠和他唑巴坦对 bla_{TEM-57} 水解抗生素有不同程度的抑制作用。pET-28a/TEM-57 重组质粒得到成功构建和诱导表达, 为进一步研究酶的其他特性及制备特异性的单克隆抗体奠定了基础。

关键词: 鸡; bla_{TEM-57} 型 β -内酰胺酶; 克隆; 原核表达; 酶特性

中图分类号: S852.612

文献标志码: A

文章编号: 1005-4545(2013)01-0032-06

Prokaryotic expression of TEM-57 type β -lactamase gene produced by fowl *Escherichia coli* and its related characteristics

WU Hua¹, LIU Bao-guang^{1,2}, PAN Yu-shan¹, HU Gong-zheng^{1*}, YUAN Li¹, LIU Jian-hua¹ (1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Department of Animal Husbandry and Veterinary, Xizang Vocational and Technical College, Lasa 850030, China)

Abstract: Objective of this study was to carry out the prokaryotic expression of bla_{TEM-57} type β -lactamase gene produced by fowl *Escherichia coli*, and identify related enzyme characteristics of the expressed products. Conjugation test was performed to determine whether the gene existed, the amplification product by PCR was subcloned into expression vector pET-28a to construct the recombinant plasmid. Identified via digestion by restriction enzymes and DNA sequencing, bla_{TEM-57} type β -lactamase was induced to express. The characteristics of antibiotic hydrolysis and inhibition of β -lactamase inhibitors on bla_{TEM-57} type β -lactamase were observed with ultraviolet spectrophotometer. Results revealed that the positive plasmid were transmitted into recipient C₆₀₀ successfully, transconjugants were resistant to penicillins and aminoglycosides. The bla_{TEM-57} gene was cloned and expressed in prokaryote cell successfully. The optimized conditions of expressing recombinant plasmid strains were 0.8 mmol/L IPTG, and 37℃ induced temperatures, and 4h induced times, respectively. The bla_{TEM-57} can hydrolyze ampicillin, amoxicillin, cefalexin, ceftiofur, ceftriaxone, cefotaxime and cefoperazone, K_m value to cefalexin was 2.4, to ceftiofur was 121.5. Sulbactam and tazobactam could effectively inhibited hydrolysis of bla_{TEM-57} on antibiotics. Recombinate plasmids of pET-28a/TEM-57 have been constructed and expressed successfully, which laid the foundation for fur-

收稿日期: 2011-10-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30771624)

作者简介: 吴 华 (1974-), 女, 实验师, 在读博士。

* 通讯作者

ther study on its other characteristics and preparation of specific monoclonal antibody.

Key words: fowl; bla_{TEM-57} type β -lactamase; cloning; prokaryotae expression; enzyme characteristics

* Corresponding author

革兰阴性菌对 β -内酰胺类药物产生耐药的主要原因是产生 β -内酰胺酶,而 TEM 型 β -内酰胺酶 (bla_{TEM}) 是流行最广且种类最多的质粒编码丝氨酸蛋白酶,其中 bla_{TEM-1} 在革兰阴性菌中最为常见,约 90% 对青霉素耐药的大肠杆菌都产生 TEM-1^[1]。目前,bla_{TEM} 在全世界广泛流行,基因亚型也在逐渐增加 (<http://www.lahey.org/studies/temtable.asp>)。在我国,苑丽曾报道的鸡大肠杆菌 bla_{TEM} 以 bla_{TEM-1} 型最为多见^[2],胡功政等^[3] 研究发现,产 bla_{TEM-1} 型菌株在药物的持续作用选择下能突变为产其他 bla_{TEM} 基因亚型或超广谱 β -内酰胺酶菌株。bla_{TEM-57} 型 β -内酰胺酶最早于 1999 年被描述^[4],国内无论在人医或兽医方面,研究 bla_{TEM} 的较多,但尚未见 bla_{TEM-57} 亚型的研究报道。直到 2009 年,本课题组检出产 bla_{TEM-57} (GenBank 序列号为: FJ405211) 的鸡大肠杆菌^[5]。本试验对 bla_{TEM-57} 基因进行了原核表达及表达条件的优化,并观察了表达产物的底物水解特性及酶抑制剂的抑酶特性,旨在为兽医临床产 bla_{TEM-57} 细菌感染的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 分离的鸡大肠杆菌 F4 株,经过 VITEK-32 全自动细菌鉴定系统鉴定。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922(购自中国普通微生物菌种保存中心,阴性对照菌);肺炎克雷伯菌 ATCC700603(购自北京大学医学部,阳性对照菌)。
1.2 药物及培养基 恩诺沙星、乳酸环丙沙星、左氧氟沙星、阿莫西林、氨苄西林、亚胺培南、头孢噻唑、头孢噻肟、头孢吡肟、多西环素、阿米卡星、氟苯尼考、利福平、头孢氨苄、头孢哌酮、舒巴坦和他唑巴坦等均为国产原料药(均在有效期内);麦康凯琼脂平板、LB 琼脂和 LB 肉汤均购自广东环凯微生物科技公司。
1.3 主要试剂 普通质粒小提试剂盒、T₄ DNA 连接酶、凝胶回收试剂盒,购自北京天根生物技术有限公司;DNA Marker 和 Premix Ex Taq 为上海莱枫生物科技有限公司;感受态细胞 BL21、X-gal、IPTG、

EcoR I 和 Xho I 均购自大连宝生物公司;E. coli C600 由河南省人民医院检验科惠赠;pET-28 α 表达载体由河南农业大学分子免疫学实验室惠赠。

1.4 主要仪器 电泳仪、琼脂糖电泳槽、蛋白质垂直电泳槽购自北京市六一仪器厂,Vitek-32 全自动细菌鉴定仪购自法国生物-梅里埃公司,恒温培养箱购自上海跃进医疗器械厂,紫外可见分光光度仪购自北京普析通用仪器有限责任公司,电子分析天平购自梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.5 质粒接合传递试验及接合子的药物表型检测 参考文献^[6]介绍的方法并略作改动,取供体菌 F4 及受体菌 C600(利福平抗性)分别接种于 5 mL LB 液体培养基,37℃ 水浴震荡孵育 12 h 后,将适量供体菌液和受体菌液混合接种于 5 mL LB 中(同时取供体菌和受体菌液培养作对照),37℃ 水浴孵育 12 h,取适量混合菌液和对照菌液分别接种于含 100 mg/L 利福平及 50 mg/L 氨苄西林的 LB 培养基上筛选阳性接合子,用微量肉汤稀释法^[7]对野生菌株及筛选到的阳性接合子进行耐药表型检测。

1.6 bla_{TEM-57} 基因的扩增

1.6.1 质粒 DNA 的提取 取临床分离的 F4 菌株过夜培养,用质粒小提快速提取试剂盒提取质粒 DNA。

1.6.2 设计引物 根据 GenBank 已发表的 TEM 基因序列,设计 1 对引物并引入 EcoR I 和 Xho I 酶切位点。TEM 上游引物:5'-CGGGAATTCATGAGTATTCAACATTTTC-3'(划线为 EcoR I 酶切位点),TEM 下游引物:5'-GGTCTCGAGTTACCAATGCTTAATCA-3'(划线为 Xho I 酶切位点)。由上海英骏生物技术有限公司合成,扩增长度为 861 bp。

1.6.3 扩增及纯化 以 bla_{TEM-57} 基因的质粒 DNA 为模板进行 PCR 反应。50 μ L 反应体系:25 μ L Premix Ex Taq 酶,上、下游引物各 1 μ L,模板 DNA 2 μ L,去离子水 21 μ L。反应参数:94℃ 预热 3 min,94℃ 变性 1 min,54℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,循环 30 次,72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色紫外投射仪下观察结果并用凝胶成像系统摄像,用凝胶回收试剂盒回收 PCR

产物。

1.7 重组质粒的构建及鉴定

1.7.1 双酶切 用 EcoR I 和 Xho I 对回收纯化后的扩增片段过夜酶切, 酶切体系为: 扩增片段 30 μL , 去离子水 18 μL , $10\times$ buffer 6 μL , EcoR I 3 μL , Xho I 3 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 12 h; 同时对 pET-28 α 纯化回收质粒按同样条件做双酶切, 酶切后用凝胶回收试剂盒回收。

1.7.2 连接转化 将酶切纯化后的 pET-28 α 质粒载体片段与回收纯化的 TEM 目的片段连接, 连接体系为: 载体片段 2 μL 、目的片段 6 μL 、 $10\times$ Buffer 1 μL 、T₄ DNA 连接酶 1 μL , 16 $^{\circ}\text{C}$ 放于低温连接槽内过夜。参照文献[8], 将连接产物转入 BL21 感受态细胞中, 然后涂于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基板上过夜筛选。

1.7.3 重组质粒 PCR 及双酶切鉴定 挑取筛选的菌落于加有卡那霉素的 LB 液体培养基内摇菌培养 16 h, 然后用 TEM 引物做菌液 PCR。PCR 鉴定阳性的菌落再次培养, 并用小提质粒试剂盒抽提重组质粒, 对重组质粒进行双酶切鉴定和 DNA 测序鉴定, 把含有 TEM 基因序列的重组质粒菌命名为 pET-28 α /TEM-57。

1.8 pET-28 α /TEM-57 重组质粒菌的诱导表达

1.8.1 不同 IPTG 浓度诱导表达 将重组质粒菌接种于 5 mL 含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜, 将菌液以 1% 的比例分别接种于 6 支 5 mL 含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 同时做阴性对照。试管菌液 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 D_{600} 值达到 0.6 时, 分别向培养液中加入终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L 的 IPTG, 恒温诱导培养 4 h, 收集诱导培养物按照文献[9]做 SDS-PAGE 电泳, 确定最佳诱导浓度。

1.8.2 不同时间诱导表达 按上述方法培养菌液至 D_{600} 值达到 0.6 时, 向培养液中加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养, 当诱导培养 2、3、4、5、6 h 时, 收集诱导培养物做 SDS-PAGE 电泳, 确定最佳诱导时间。

1.8.3 不同温度诱导表达 按上述方法培养菌液至菌液 D_{600} 值达到 0.6 时, 向培养液中加入 IPTG 最适浓度为 0.8 mmol/L, 分别放于 37、30 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温振荡培养箱中按最佳诱导时间 4 h 进行振荡培养, 收集菌液做 SDS-PAGE 电泳, 确定最适表达温度。

1.9 bla_{TEM-57} 酶特性试验

1.9.1 重组质粒菌的大量诱导表达及 β -内酰胺酶提取 取 100 mL 经最适宜浓度 IPTG 诱导 4 h 后

的菌液, 室温 6 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 沉淀物用 10 mL 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 冲洗 2 遍, 然后在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 及 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴交替冻融 (在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 环境 20 min/次), 反复 10 次, 加入 5 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0), 漩涡混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 1 h, 取上清。上清液即为 β -内酰胺酶提取液, 用显色的头孢硝噻吩纸片鉴定。

1.9.2 β -内酰胺类抗生素吸收波长测定与确定

以 β -内酰胺类抗生素阿莫西林、氨苄西林、头孢氨苄、头孢曲松钠、头孢噻肟钠、头孢噻吩钠和头孢哌酮为水解底物, 在各药物终浓度为 10^{-4} mol/L 用紫外分光光度计进行波长扫描, 选取吸收幅度最大且稳定的波长为各底物的最佳吸收波长。最佳吸收波长分别为: 阿莫西林 286 nm、氨苄西林 220 nm、头孢氨苄 256 nm、头孢曲松钠 240 nm、头孢噻肟钠 238 nm、头孢噻吩钠 292 nm、头孢哌酮 255 nm。

1.9.3 bla_{TEM-57} 的底物水解试验 以 β -内酰胺类抗生素为水解底物, 取浓度分别为 10、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 的药液各 3 mL, 另取 1 支试管加入 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 3 mL 作对照, 依次放于 7 支试管中, 各试管加入 β -内酰胺酶提取物 30 μL , 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴培养 30 min, 温浴结束后, 在相应最佳波长处立即测定加酶前及加酶水解后各底物的 D 值, 根据反应前后 D 值变化, 计算酶对各种底物的水解率。酶对抗生素的水解率 = $[(\text{底物 } D \text{ 值} - \text{底物加酶水解后 } D \text{ 值}) / \text{底物 } D \text{ 值}] \times 100\%$ 。同时, 根据最佳波长处各药物不同浓度时的 D 值, 建立标准回归方程, 按照 Hanes-Woolf $([S]/V - [S])$ 方程, 利用线性回归计算酶对不同底物的米氏常数 (K_m)。

1.9.4 酶抑制剂的抑酶保护试验 以阿莫西林等 β -内酰胺类抗生素为水解底物, 根据 β -内酰胺酶对 β -内酰胺类药物的水解率不同, 以水解率在 50% 左右的药液浓度作为该试验的底物终浓度, 酶抑制剂舒巴坦和他唑巴坦与底物按质量比 1:2 配比, 反应体系为 3 mL。将酶抑制剂和 30 μL 酶提取物放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min, 然后加入底物温浴 30 min, 立即测其 D 值, 计算酶抑制剂的抑酶保护率。酶抑制剂的抑酶保护率 = $[(\text{不加抑制剂水解率} - \text{加抑制剂水解率}) / \text{不加抑制剂水解率}] \times 100\%$ 。

2 结果

2.1 质粒接合及接合子耐药表型 供体菌 F4 株能通过质粒接合把对部分药物的耐药性传递给受体菌。接合子及临床分离菌 F4 株的表型检测结果见

表 1, 受体菌 C600 仅对利福平耐药 MIC 值大于 128 mg/L; 而供体菌 F4 对阿莫西林、氨苄西林、氟喹诺酮类、氨基糖苷类(阿米卡星、庆大霉素和新霉素)、多西环素、氟苯尼考呈现多重耐药, 联合使用 β -内酰胺酶抑制剂后 MIC 值有所下降, 说明该菌对抑制剂敏感; 接合子对氟喹诺酮类、氟苯尼考、多西环素变为敏感, 但对阿莫西林、氨苄西林、氨基糖苷类药物耐药。

2.2 bla_{TEM-57} 基因的扩增结果 用设计的 TEM 型引物对 F4 菌株质粒 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 获得与预期扩增长度相符合的特异性目的条带, 测序证明为 TEM-57 基因序列。

2.3 pET-28 α /TEM-57 重组质粒 PCR 及酶切鉴定 TEM-57 基因片段与 pET-28 α 表达载体连接转化后, 抽提重组质粒进行 PCR 扩增、电泳, 在约 861 bp 处出现目的条带。重组质粒经 EcoR I 和 Xho I 双酶切、电泳, 产物出现 2 条带, 其中 1 条带为表达载体质粒(约 5 369 bp), 另一条带为所克隆的 TEM-57 基因片段(图 1)。重组质粒经测序鉴定表明, 其插入片段与 TEM-57 型 β -内酰胺酶基因序列完全一致, 表明重组质粒 pET-28 α /TEM-57 构建成功。

表 1 临床分离株、阳性接合子及 C600 的药物敏感性试验
mg/L

抗菌药物	各菌株 MIC		
	C600	F4	接合子
阿莫西林	4	>128	64
阿莫西林/克拉拉酸(4:1)	4	8	8
氨苄西林	8	>128	128
氨苄西林/舒巴坦(2:1)	8	8	8
头孢噻肟	<0.062	8	4
头孢曲松	<0.062	32	8
头孢噻唑	1	1	0.500
亚胺培南	0.250	0.500	<0.062
头孢吡肟	0.125	<0.062	<0.062
环丙沙星	1	16	<0.062
左氧沙星	1	32	<0.062
氟苯尼考	1	16	1
多西环素	0.250	32	<0.062
阿米卡星	0.500	>128	64
新霉素	0.125	64	32
庆大霉素	0.25	>128	32
利福平	>128	32	128

2.4 pET-28 α /TEM 重组质粒菌的诱导表达结果

2.4.1 不同 IPTG 浓度诱导表达结果 pET-28 α /TEM 重组质粒菌在 37℃、IPTG 浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L 条件下诱导 4 h 进

行表达, 其 SDS-PAGE 电泳结果表明, pET-28 α /TEM 重组质粒菌在 0.8 mmol/L IPTG 浓度时蛋白表达量较大(图 2)。

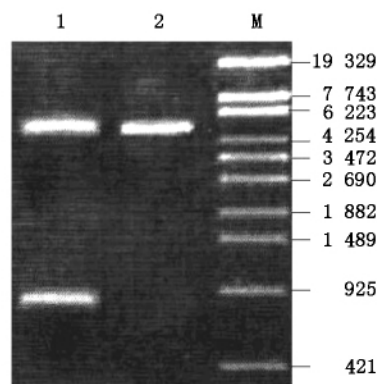


图 1 重组质粒双酶切电泳图 M. λ -EcoT 14 I digest; 1. 重组质粒 pET-28 α /TEM-57; 2. pET-28 α 质粒

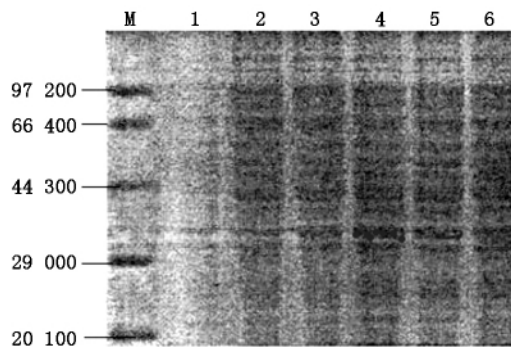


图 2 不同 IPTG 浓度诱导重组质粒菌 pET-28 α /TEM-57 的电泳图 M. 蛋白 Marker; 1~6. IPTG 浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L 诱导重组质粒菌 pET-28 α /TEM-57

2.4.2 不同时间诱导表达 pET-28 α /TEM 重组质粒菌在 37℃、IPTG 浓度为 0.8 mmol/L 条件下分别诱导 2、3、4、5、6 h 进行表达, pET-28 α /TEM 重组质粒菌诱导 4 h 时蛋白表达量较大。

2.4.3 不同温度诱导表达 pET-28 α /TEM 重组质粒菌在最适宜 IPTG 浓度 0.8 mmol/L 条件下, 于 37、30℃ 条件下分别诱导 4 h 进行表达, SDS-PAGE 电泳表明, pET-28 α /TEM 重组质粒菌在 37℃ 诱导条件下蛋白表达量较大。

2.5 bla_{TEM-57} 酶特性试验结果

2.5.1 底物水解试验结果 bla_{TEM-57} 酶提取物对 8 种 β -内酰胺类药物的水解率见表 2。从表中可看出, 在药物浓度 10~100 μ mol/L 之间, 该酶对药物的水解率随药物浓度升高而降低。bla_{TEM-57} 对氨苄西林及头孢氨苄的 K_m 值相对较小, 说明该酶对这 3 种药物亲和力最强, 即这几个药物最易水解; 对头

孢噻唑钠的 K_m 值最大为 121.5, 说明该酶对头孢噻唑钠的亲合力最弱, 即该药最难水解。

表 2 TEM-57 型 β -内酰胺酶对 8 种 β -内酰胺类抗生素的水解率

%

抗菌药物	10 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$	40 $\mu\text{mol/L}$	60 $\mu\text{mol/L}$	80 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$	K_m
阿莫西林	100	100	90.8	89.4	49.3	21.5	U
氨苄西林	100	94.3	87.3	59.4	30.2	10.8	5.8
头孢氨苄	100	94.4	78.2	41.3	20.7	12.4	2.4
头孢曲松	92.3	67.1	44.6	30.1	14.2	3.4	35.9
头孢噻肟	74.6	63.7	45.7	29.6	12.6	5.1	82.4
头孢噻唑	56.4	43.9	27.3	16.5	9.3	2.4	121.5
头孢哌酮	100	82.1	64.2	55.4	39.1	32.1	29.6

注: U 无法测定

2.5.2 酶抑制剂的抑酶保护试验结果 酶抑制剂舒巴坦和他唑巴坦对 β -内酰胺类抗生素的抑酶保护作用试验结果见表 3。舒巴坦和他唑巴坦对 bla_{TEM-57} 均有一定的抑制作用, 对阿莫西林的抑酶保护率均最高 (分别为 87.3% 和 92.4%)。他唑巴坦对阿莫西林、氨苄西林及头孢曲松钠的抑酶保护作用强于舒巴坦, 但他唑巴坦对头孢噻唑钠的抑酶保护作用弱于舒巴坦。舒巴坦对头孢氨苄、头孢噻肟钠及头孢哌酮的抑酶保护率为 0, 而他唑巴坦仅对头孢氨苄的抑酶保护率为 0。

表 3 酶抑制剂的抑酶保护率

%

抗菌药物	舒巴坦	他唑巴坦
阿莫西林	87.3	92.4
氨苄西林	74.6	82.1
头孢氨苄	0	0
头孢曲松	19.2	28.6
头孢噻肟	0	11.3
头孢噻唑	75.2	58.7
头孢哌酮	0	11.2

3 讨论

bla_{TEM} 型 β -内酰胺酶能够水解氨苄西林, 但能被克拉维酸抑制^[10]。bla_{TEM-1} 是第一个被人们认识的 β -内酰胺酶, 在革兰阴性菌中最常见, 现已在世界范围内被报道, 其流行最广、检出率最高。目前, bla_{TEM} 的分布已由最早的欧美国家发展到了世界各地, 而中国所分布的 bla_{TEM} 酶以 bla_{TEM-1} 最常见^[2, 11-12], 同时 bla_{TEM-12}^[13]、bla_{TEM-105}^[14]、bla_{TEM-116}^[15]、bla_{TEM-141} 及 bla_{TEM-157}^[16]、bla_{TEM-166}^[17] 等也有报道。本试验用本实验室在国内检出的 bla_{TEM-57}, 通过 PCR 扩增获得 bla_{TEM-57} 基因, 将其克隆入表达载体构建重组质粒, 使其诱导表达, 并初步研究了酶的相关特性, 为掌握细菌产酶的耐药机制、合理选用酶抑制剂及兽用抗菌药物新复方研制提供了理论依据。

bla_{TEM-57} 基因编码 286 个氨基酸, 其基因序列与 AY293072 (TEM-1) 相比, 269 位碱基突变 (G→A) 引起相应 92 位氨基酸突变 (甘氨酸→天冬氨酸)。

药敏试验表明, 产 bla_{TEM-57} 的 F4 菌株对阿莫西林、氨苄西林耐药, 但对第三代头孢菌素、亚胺培南均敏感, 这与王慧等^[17]报道的产 bla_{TEM-166}、bla_{TEM-1} 菌株及 Bonnet 等^[4]报道的产 bla_{TEM-57} 菌株的耐药特性一致, 说明产 bla_{TEM-57} 较 bla_{TEM-1} 型 β -内酰胺酶的耐药谱并未扩大, 应为广谱 β -内酰胺酶。 β -内酰胺酶抑制剂与氨苄西林联用能降低 F4 菌株的耐药性, 这与胡功政等^[18]报道的结果一致。质粒接合表明, bla_{TEM-57} 基因及对阿莫西林、氨苄西林的耐药性, 可通过质粒传递给受体菌。接合子还对氨基糖苷类耐药, 推测携带 bla_{TEM-57} 基因的质粒上, 可能还同时携带对氨基糖苷类的耐药基因。

本试验选用的大肠杆菌表达载体 pET-28 α , 是一个融合表达载体, 带有 His 标签和 T7 标签序列, 使所得的重组蛋白能通过金属离子 (Ni²⁺) 配体亲和层析快速纯化, 故该载体具有表达效率高、产物易于纯化等优点^[19]。鸡大肠杆菌产 bla_{TEM-57} 基因所表达的蛋白编码 286 个氨基酸 (相对分子质量大约为 29 000), 其融合表达产物的 N 端融合了 36 个氨基酸残基 (相对分子质量大约为 4 000), 因此融合表达产物共有 322 个氨基酸残基 (相对分子质量大约为 33 000)。由 SDS-PAGE 电泳检测可知, 融合蛋白表达条带所处位置的相对分子质量大约为 33 000, 表明 TEM-57 基因在大肠杆菌中成功表达出 TEM-57 型的融合蛋白。通过对表达条件的优化, 确立的最佳蛋白表达条件为获得高纯度的 bla_{TEM-57} 提供了基础。

β -内酰胺酶对 β -内酰胺类药物的水解作用是由于 β -内酰胺酶对药物分子上 β -内酰胺环的乙酰化和去乙酰化反应而使 β -内酰胺环打开使药物失效, 其中去乙酰化过程是 β -内酰胺酶水解作用的限速反应^[20]。从水解试验结果可知, bla_{TEM-57} 对头孢氨苄的 K_m 值最小为 2.4, 即对该药亲合力最强, 水解效率最高, 稳定性最差。该酶对头孢噻唑钠的 K_m 值最大为 121.5, 即对该药亲合力最弱, 最难水解, 稳定性最好。这与孙亚伟等^[21]报道的 bla_{TEM-1V} 对头孢曲松

K_m 值最大存在差异。从抑酶保护试验可知,他唑巴坦对阿莫西林、氨苄西林及头孢曲松钠的抑酶保护作用强于舒巴坦,这与孙亚伟等^[21]报道的他唑巴坦对 bla_{TEM-1V} 水解头孢曲松钠的抑制作用优于舒巴坦研究结果相符。此外,bla_{TEM-57} 较难水解头孢噻唑钠,同时舒巴坦及他唑巴坦对该底物又有较好的抑酶保护作用,所以头孢噻唑钠与舒巴坦、他唑巴坦联用是治疗产 bla_{TEM-57} 型 β -内酰胺酶细菌感染的较好方法。因此,寻找对 K_m 值稳定、不易被水解或对 β -内酰胺酶有抑制作用的抗生素是今后 β -内酰胺酶的研究方向。

本试验选用 pET-28 α 高效原核表达载体对 TEM-57 基因进行了原核表达及酶特性研究,对分析 β -内酰胺酶耐药基因质粒接合传递及耐药机制研究都具有重要作用,对指导兽医临床合理搭配用药及产酶细菌感染的治疗具有重要的指导意义。pET-28 α /TEM-57 重组质粒的成功构建和诱导表达,为进一步研究酶的其他特性及制备特异性的单克隆抗体奠定了基础。

参考文献:

- [1] Bradford P A. Extended-spectrum β -Lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this imponent resistance threat[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14: 933-951.
- [2] 苑丽, 刘建华, 胡功政, 等. 鸡大肠杆菌 TEM 和 CTX-M 型超广谱 β -内酰胺酶基因分型研究[J]. 中国农业科学, 2010, 43(20): 4310-4316.
- [3] 胡功政, 孙亚伟, 陈红英, 等. 鸡志贺氏菌产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的分子进化[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 593-598.
- [4] Bonnet R, De Champs C, Sirot D, et al. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*[J]. Antimicrobial Agents Chemother, 1999, 43(11): 2671-2677.
- [5] Yuan L, Liu J H, Hu G Z, et al. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan Province, China[J]. J Med Microbiol, 2009, 58: 1449-1453.
- [6] Girlich D, Poirel L, Leclaporn A, et al. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok Thailand[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1): 175.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M100-S18 performance standards for antimicrobial susceptibility testing, eighteenth informational supplement[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania: 2008, 28(1): 1-83.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版, 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 87-105.
- [9] Henrik H, Dik M, Kees V. β -lactamases among extended spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in the Netherlands[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56: 115-121.
- [10] Paterson D L, Bonomo R A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(4): 657-686.
- [11] 季淑娟, 顾怡明, 谭文涛, 等. 中国部分地区大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌超广谱 β -内酰胺酶基因型研究[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27: 590-593.
- [12] 张珍珍, 吴俊伟, 魏述永, 等. 动物源大肠杆菌超广谱 β -内酰胺酶与头孢菌素酶基因型分析[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(6): 898-903.
- [13] 王瑶, 徐英春, 杨启文, 等. 19 家医院大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中 TEM 型 β -内酰胺酶的研究[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(2): 85-89.
- [14] 李家斌, 李旭, 马亦林, 等. TEM-105 编码基因的功能研究[J]. 中国药理学报, 2005, 21(2): 163-164.
- [15] Hu G Z, Chen H Y, Si H B, et al. Phenotypic and molecular characterization of TEM-116 extended-Spectrum β -lactamase produced by a *Shigella Flexneri* clinical isolate from chickens[J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 279: 162-166.
- [16] Liu G, Ling B D, Xie Y E, et al. Characterization of CTX-M-22 and TEM-141 encoded by a single plasmid from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* in China[J]. Jpn J Infect Dis, 2007, 60: 295-297.
- [17] 王慧, 熊自忠, 李睿. TEM 型 β -内酰胺酶新亚型 TEM-166 编码基因的克隆表达[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(2): 120-122.
- [18] 胡功政, 许兰菊, 苑丽, 等. β -内酰胺酶抑制剂舒巴坦与氨苄西林联用的体内外抗菌作用研究[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(4): 389-394.
- [19] Schaller A, Kuhnert P, de la Puente-Redondo V A, et al. Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals[J]. Vet Microbiol, 2000, 74: 365-376.
- [20] Doritza P R, Xiang Z. Tazobactam inactivation of SHV-1 and the inhibitor-resistant Ser130-Gly SHV-1 β -lactamase[J]. J Biological Chem, 2004, 279 (19): 19494-19501.
- [21] 孙亚伟, 胡功政, 陈红英, 等. 鸡福氏志贺菌产超广谱 β 2 内酰胺酶 SHV-12 和 TEM-1V 基因的重组表达及酶特性[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(5): 566-571.