

· 论 著 ·

# 产 CMY 型 AmpC 酶费劳地枸橼酸杆菌的分子学特性研究\*

张晓坤<sup>1</sup>, 徐韞健<sup>2</sup>, 廖伟娇<sup>2</sup>, 张东梅<sup>2</sup>, 张丽梅<sup>2</sup>

(1. 广州医学院荔湾医院检验科 510170; 2. 广州医学院附属第一医院检验科 510120)

**摘要:**目的 对产 CMY 型 AmpC 酶费劳地枸橼酸杆菌进行耐药表型及分子学特性进行研究, 探讨研制新的酶抑制剂。方法 对临床分离的两株费劳地枸橼酸杆菌所产 CMY 型 AmpC 酶用纸片扩散法、三相水解试验进行耐药表型检测, 以该菌总基因组 DNA 和质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增、序列分析、质粒接合试验、构建重组表达载体及 AmpC 酶检测。结果 两株菌株对青霉素类、头孢菌素类、喹诺酮类、氨基糖苷类抗生素均表现为耐药, 对喹喏类和碳青霉烯类表现为敏感; 三相水解试验结果显示该菌能水解头孢西丁; PCR 扩增出大小为 1 146 bp 的基因片段, 与 GenBank 上多种 CMY 亚型的基因序列同源性为 97%; 质粒接合试验证实质粒上含 CMY 基因, 为可转移质粒。结论 两株菌株所产 CMY 型 AmpC 酶为新的 CMY 型头孢菌素酶, 它介导了该菌对青霉素类、头孢菌素类、喹诺酮类等抗生素耐药, 其耐药性能水平传播。

**关键词:** β-内酰胺酶类; 费劳地枸橼酸杆菌; 分子学特性; CMY 型

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 07. 005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)07-0731-03

## Study on molecule characteristics of a novel CMY-type AmpC β-Lactamase from *Citrobacter freundii*

Zhang Xiaokun<sup>1</sup>, Xu Yunjian<sup>2</sup>, Liao Weijiao<sup>2</sup>, Zhang Dongmei<sup>2</sup>, Zhang Limei<sup>2</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Liwan Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, 510120)

**Abstract: Objective** To investigate the antibiotic phenotype and moleculelogy characteristics of novel CMY-type AmpC β-Lactamase from *Citrobacter freundii*, in order to triturate homologue enzyme inhibitors. **Methods** Slip diffusion method and three-phase hydrolyses test were used to analyze antibiotic phenotype of novel CMY-type AmpC β-Lactamase from *Citrobacter freundii* that was detached from clinic, The DNA and plasmid of CMY-type AmpCβ-Lactamase from *Citrobacter freundii* Strain was amplified by PCR, sequence analysis, Plasmid Conjugation tests, construction recombinant expression vector and AmpC induce tests. **Results** Two strains were resistant to penicillins, cephalosporin, quinolone, aminoglycoside, and susceptible to nitrofurantoin, carbapenem, The results of three-dimension test showed, AmpCβ-Lactamase from DNA Strain and recombinant strain could hydrolyz cefoxitin, The 1 146bp DNA fragment of CMY-type AmpC β-Lactamase encoding gene sequence shared 97 % amino acid identity with CMY-type AmpC β-Lactamase that already registered in GenBank. Plasmid Conjugation tests showed bla CMY located in plasmid and plasmid could conjugate. **Conclusion** The CMY-type AmpC β-Lactamase is a novel CMY-type AmpC cephalosporinase. It is resistant to penicillins, cephalosporin, quinolone, and it's drug resistance can be transmitted.

**Key words:** beta-lactamases; *Citrobacter freundii*; moleculelogy characteristics; CMY type

随着 β-内酰胺类抑制剂复合剂等抗菌药物的广泛应用, 费劳地枸橼酸杆菌的耐药性日益严重, 不仅出现了产超广谱 β-内酰胺酶(extended-spectrum β-lactamase, ESBLs)、碳青霉烯酶(CHBLs)的菌株, 而且出现复合产酶的泛耐药菌株, 导致该菌的感染治疗困难, 阴沟肠杆菌、费劳地枸橼酸杆菌、粘质沙雷菌、摩根摩根菌及铜绿假单胞菌染色体上天然存在 ampC 基因, 可被青霉素类和头孢菌素类 β-内酰胺抗生素诱导产生 AmpC 酶<sup>[1-3]</sup>。AmpC 酶是指由革兰阴性杆菌产生的不被克拉维酸抑制的“丝氨酸”头孢菌素酶, 头孢菌素酶最初出现在阴沟肠杆菌、费劳地枸橼酸杆菌等细菌中的染色体介导的 AmpC 酶, 可在同种或不同种属细菌间广泛播散, 常常合并产 ESBLs<sup>[4]</sup>。产生 AmpC 酶的细菌对青霉素类、头孢菌素类、头霉素类、单环内酰胺类、酶抑制剂耐药, 且这些菌株往往同时携带氨基糖苷类、氯霉素、四环素等药物的耐药基因, 造成多重耐药, 是造成医院暴发感染的主要病原菌<sup>[5]</sup>。本组对两株费劳地枸橼酸杆菌进行表型检测, PCR 扩增, 基因克隆, 序列分析, 质粒接合试验, 构建重组表达载体及原菌株与重组菌株进行 AmpC 酶等方法对其分子生物学特性进行探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 该院临床分离的两株产 CMY 型 AmpC 酶的费劳地枸橼酸杆菌(编号为 30, 31); *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* DH5α, *E. coli* HB101Rif<sup>r</sup> 和表达载体 pBV220 为实验室保存; pGEM-T 载体购自 Promega 公司。

**1.2 主要试剂** VITEK-2 GNP 药敏卡购自生物梅里埃公司; T4DNA 连接酶购自 Promega 公司; 限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I、Taq 酶、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自大连宝生物公司。

**1.3 表达引物设计** 以 GeneBank 上 CMY-2 型 AmpC 酶基因序列(登陆号: AM779748)为参考模板, 设计合成两条引物, 上游引物和下游引物分别引入限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 识别位点。由上海英俊生物公司合成。CMY-F: 5'-CCG GGA TCC ATG ATG AAA AAA TCG TTA TGC TGC-3' (1 bp); CMY-B: 5'-CCG GAA TTC TTA TTG CAG CTT TTC AAG AAT GCG-3' (1 146 bp)。

## 1.4 方法

**1.4.1 AmpC 酶的检测** 采用 K-B 法头孢西丁药敏试验, 根据

\* 基金项目: 广东省科技厅项目(2008B060600046); 广州市医药卫生科技项目(2007-YB-156)。

文献[6]的报道,抑菌环直径头孢西丁小于或等于 18 mm,为可疑产 AmpC 酶。药物敏感试验以 *E. coli* ATCC 25922 为质控菌株,用 VITEK-2 GNP 药敏卡测定两株费劳地枸橼酸杆菌的 MIC。结果判定参照 CLSI 标准[7]。 $\beta$ -内酰胺酶提取液的制备,挑取 1~2 个菌落转种至 100 mL 含 Amp 的 LB 肉汤中,37 °C 恒温摇床孵育 24 h。4 °C,8 000 r/min,离心 10 min,离心半径 8 cm,收集细菌。冰浴下,用超声破碎仪破碎菌体,4 °C,21 000 r/min,离心 10 min,离心半径 8 cm,收集上清液,即为  $\beta$ -内酰胺酶提取液,-70 °C 保存备用。三相水解试验:用 0.5 麦氏单位 *E. coli* ATCC 15922 菌液,涂布于 M-H 平板,贴头孢西丁(30  $\mu$ g)纸片,距纸片边缘 5 mm 处向外切出 4 个垂直的宽 1 mm、长 20 mm 狭缝,每缝加入待测菌酶提取液 40  $\mu$ L,35 °C 培养过夜,观察结果。

**1.4.2 细菌总 DNA、质粒 DNA 的提取和 PCR 扩增** 加热裂解法提取细菌总 DNA,碱裂解法提取质粒[8]。以细菌总 DNA 和质粒为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为:预变性 95 °C 3 min,95 °C 35 s,53 °C 35 s,72 °C 50 s,共循环 35 次;最后 72 °C 再延伸 10 min。

**1.4.3 pGEM-T/CMY 重组质粒的构建及序列分析** PCR 产物切胶回收后,将纯化的目的基因与 pGEM-T 载体按 3:1 的克隆分子浓度 4 °C 连接过夜。将连接反应液转化至感受态菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,涂布至含异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷和 X-gal 的氨苄 LB 平板,37 °C 培养 16 h。挑选白色菌落进行菌落 PCR 筛选,提取阳性菌落的质粒,经 EcoR I 和 BamH I 双酶切鉴定后,将克隆菌送上海英俊生物公司进行双向测序,测序结果在 GeneBank 上进行查询比对。

**1.4.4 pBV220/CMY 重组表达载体的构建** 双酶切 pGEM-T/CMY 后切胶回收,将纯化的目的基因与 pBV220 按 7:1 的克隆分子浓度 4 °C 连接过夜。将连接反应液转化至感受态菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,涂布至含氨苄 LB 平板,37 °C 培养 16 h。挑选菌落进行 PCR 筛选,提取阳性菌落的质粒,经双酶切鉴定后,将重组菌测序。

**1.4.5 质粒接合试验** 将两株费劳地枸橼酸杆菌作为供体菌分别和受体菌 *E. coli* HB101Rif<sup>r</sup> 在 2 mL LB 液体培养基中 37 °C,180 r/min 振荡培养 6 h。以 1:10 比例接种于 0.5 mL LB 液体培养基,37 °C 振荡培养 2 h。供体菌、受体菌和接合菌分别涂布含利福平(100  $\mu$ g/mL)和头孢西丁(64  $\mu$ g/mL)的 M-H 平板,37 °C 培养 16 h。挑单个菌落鉴定,以判断是否发生质粒转移,再经 VITEK-2 系统鉴定接合菌是否为大肠埃希菌。

**2 结 果**

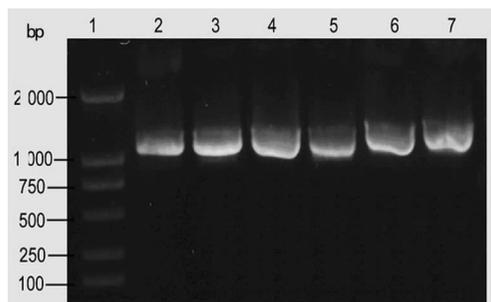
**2.1 K-B 法头孢西丁药敏试验**,3 种菌的抑菌环直径头孢西丁均小于 18 mm。

**2.2 三相水解试验结果**,30、31 号菌株和重组菌株的平皿上出现沿槽周围生长指向头孢西丁纸片的矢状菌苔,表明该酶能水解相应的抗菌药物。初步证实构建的重组表达载体 pBV220/CMY 能产生 AmpC 酶。

**2.3 药敏结果显示** 两株菌株耐药现象较为严重,对青霉素类(氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦)、第 4 代头孢菌素、喹诺酮类(环丙沙星、左旋氧氟沙星)、部分氨基糖苷类(庆大霉素)耐药,对部分氨基糖苷类(丁胺卡那霉素)、碳青霉烯类(厄它培南、亚胺培南)、呋喃类(呋喃妥因)表现为敏感。

**2.4 总 DNA、质粒与接合子质粒的 PCR 扩增结果** 两种质粒接合子经质粒提取后,和原菌株的总 DNA、质粒进行 PCR 扩增,均可得到 1 146 bp 左右的片段。证明 CMY 基因位于费

劳地枸橼酸杆菌的质粒和染色体上,并可在质粒间进行转移,见图 1。



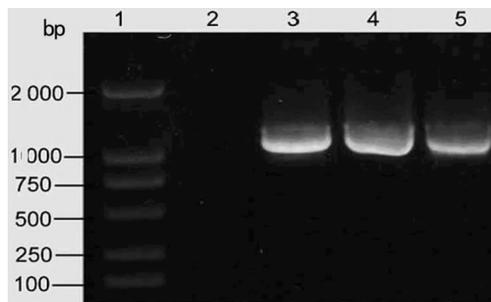
1 为 L2 000 DNA 分子标记;2~3 为 30、31 号菌株总 DNA 的 PCR 产物;4~5 为 30、31 号菌株质粒 DNA 的 PCR 产物;6~7 为 30、31 号接合菌质粒 DNA 的 PCR 产物。

图 1 PCR 产物电泳图

**2.5 pGEM-T/CMY、pBV220/CMY 重组质粒的构建和序列分析:**pGEM-T/CMY 重组质粒经 EcoR I 和 BamH I 酶切后获得的片段大小约为 1 146 bp 和 3 000 bp,pBV220/CMY 经 EcoR I 和 BamH I 酶切后获得的片段大小约为 1 146 bp 和 3 666 bp,证明 PCR 产物已经成功克隆入 pGEM-T 和 pBV220 载体。

核苷酸序列分析结果显示,30、31 号菌株的 CMY 基因序列相同,目的基因片段大小为 1 146bp。再采用 Primer Walking 测序。按照测序结果向测出的可靠序列中设计了一引物继续测序,并将测序结果拼接。合并序列经 ClustalW2 同源性比较,与 GenBank 上登录的 CMY-2、22、24、28、29、30、31 有 97% 相符。此基因为 CMY 新亚型,GenBank 上登陆号:EU274302。

**2.6 质粒接合试验** 30、31 号费劳地枸橼酸杆菌的质粒上都含有 CMY 基因,为可转移质粒,检出率达 75%。见图 2。



1 为 L2000DNA 分子标记;2 为阴性对照;3 为 30 号菌 CMY 的 PCR 产物;3~5 为 30、31 号菌株接合子的 PCR 产物。

图 2 接合子 PCR 产物电泳图

**3 讨 论**

费劳地枸橼酸杆菌是临床常见病原菌之一,在医院感染中占很重要的地位。由于  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物的广泛应用,其耐药性日益严重,不仅出现了 ESBLs、CHBLs 的菌株,而且出现复合产酶的泛耐药菌株,导致该菌感染的治疗困难[1-3]。本研究的两株费劳地枸橼酸杆菌除产 AmpC 酶外,还产 ESBLs,因此,它们表现出对青霉素类、第 4 代头孢菌素、喹诺酮类、部分氨基糖苷类抗生素的多重耐药。

AmpC 酶是指由革兰阴性杆菌产生的不被克拉维酸抑制的“丝氨酸”头孢菌素酶,属 Bush-J-M1 群,它们在分子结构上具有同源性,按 Ambler 分子结构分类为 C 类的头孢菌素酶,

其优先选择的底物为头孢菌素类,与 ESBLs 不同的是对头孢烯类抗生素(如头孢西丁)高水平耐药,并不被克拉维酸所抑制。阴沟肠杆菌、费劳地枸橼酸杆菌、粘质沙雷菌、摩根摩根菌及铜绿假单胞菌染色体上天然存在 ampC 基因,可被青霉素类和头孢菌素类 β-内酰胺抗生素诱导产生 AmpC 酶,可分为诱导型、结构型和质粒介导型。

自 20 世纪 80 年代末首次分离出质粒介导的 AmpC 酶以来,新的质粒介导的 AmpC 酶在世界各地被陆续报道(如 MIR、ACT、DHA、CMY、FOX、MOX 型质粒 AmpC 酶等),迄今已有近 30 多种<sup>[9]</sup>。大多数质粒介导的 AmpC 酶来源于染色体 AmpC 酶,通过转座子、整合子和插入序列在染色体与质粒之间转移<sup>[10]</sup>。产生 AmpC 酶的细菌对青霉素类、头孢菌素类、头霉素类、单环内酰胺类、酶抑制剂耐药,且这些菌株往往同时携带氨基糖苷类、氯霉素、四环素等药物的耐药基因,造成多重耐药。根据同源性分析可将质粒介导的 AmpC 酶分为:来源于枸橼酸杆菌的 ampC 基因的有 CMY-2、4、5、6、7 酶;来源于铜绿假单胞菌的有 CMY-1、8、9、10、11。CMY-2 是最流行的酶型,地理位置分布也最广泛,它在非洲、欧洲、亚洲以及北美洲的多个国家被发现<sup>[11]</sup>。费劳地枸橼酸杆菌染色体及质粒介导引起的耐药在国外多见<sup>[4-5,10]</sup>,由质粒介导的 CMY 型 AmpC 酶在国内罕见报道,国内只有管希周等<sup>[12]</sup>和廖伟娇等<sup>[13]</sup>检出过。由于编码 AmpC 酶的耐药质粒可在不同菌属细菌之间水平传播导致医院内感染的暴发,如中国台湾地区(CMY-2、CMY-8)引起的暴发感染。因此很有必要从分子流行病学角度来监测这些产酶株的耐药性及流行状况。

本研究通过接合试验证实 30、31 号试验菌株费劳地枸橼酸杆菌的染色体与质粒均携带 CMY 基因。CMY 的 PCR 产物合并序列与 GeneBank 上的 CMY-2、22、24、28、29、30、31 等各有 97% 的同源性,但在中间序列发生了多处的突变,是一种新型的 CMY 基因型, GeneBank 登陆号为 EU274302。本研究以产 CMY 型 AmpC 酶费劳地枸橼酸杆菌总基因组 DNA 为模板,扩增出 CMY 型基因,成功构建 pBV220/CMY 重组表达载体,为下一步 CMY 型 AmpC 酶的表达和纯化以及研制酶抑制剂奠定了基础。

参考文献

[1] Kim J, Lim YM. Prevalence of derepressed ampC mutants and ex-

tended-spectrum beta-lactamase producers among clinical isolates of *Citrobacter freundii*, *Enterobacterspp*, and *Serratia marcescens* Korea: dissemination of CTX-M-3, TEM-52 and SHV-12[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5): 2452-2455.

[2] 李金钟,刘利平. KPC 碳青霉烯酶及检测的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(4): 357-359.

[3] 骆俊,朱德妹,徐晓刚,等. 泛耐药费劳地柠檬酸杆菌产 β-内酰胺酶及同源性[J]. 中华传染病杂志, 2006, 24(5): 291-295.

[4] Barlow M, Hall BG. Origin and evolution of the AmpCβ-lactamases of *Citrobacter freundii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(17): 1190-1198.

[5] 张永标,张扣兴,唐英春,等. 产质粒介导的 AmpC 酶和 ESBLs 细菌的耐药性及 β-内酰胺酶基因型研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(14): 577-582.

[6] 沈定霞,罗燕萍,曹敬荣,等. 肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌中 ES-  
BLs 和 AmpC 酶基因的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 8(2): 850-852.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement M100-S19[S]. Wayne, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

[8] 萨姆布鲁克·拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 27-30.

[9] Philippon A, Arlet GA. Plasmid-determined AmpC-typeβ-lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(6): 1-11.

[10] Raskine L, Borrel I, Barnaud G, et al. Novel plasmid-encoded class Cβ-  
lactamase (MOX-2) in *Klebsiella pneumoniae* from Greece [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(21): 2262-2265.

[11] 陈轶兰,王辉,吴伟元,等. 大肠埃希菌中质粒 AmpC 型 β-内酰胺酶基因型的检测[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2002, 2(11): 158-161.

[12] 管希周,刘又宁,罗燕萍,等. 新 CMY 型头孢菌素酶在大肠埃希菌中的流行[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(3): 1872-1875.

[13] 廖伟娇,江洁华,易建云,等. 华南地区出现新型 CMY 型 AmpC β-内酰胺酶[J]. 中国医师杂志, 2006, 5(1): 625-628.

(收稿日期: 2010-06-30)

(上接第 730 页)

学杂志, 2009, 23(7): 395-396.

[16] Inaki A, Javier C, Xavier D, et al. The Rheumatoid Arthritis-Associated Allele HLA-DR10(DRB1 \* 1001) Shares Part of Its Repertoire with HLA-DR1 (DRB1 \* 0101) and HLA-DR4 (DRB \* 0401)[J]. ARTHRITIS & RHEUMATISM, 2008, 58(6): 1630-1639.

[17] 史敦云,张琼丽,刘积良,等. 乳腺癌患者外周血树突状细胞亚群及其 HLA-DR 表达的变化[J]. 中国病理生理学杂志, 2008, 24(7): 1331-1334.

[18] Sakaura K, Chikamatsu K, Takahashi K, et al. Maturation of circulating dendritic cells and imbalance of T-cell subsets in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(2): 151-159.

[19] Meora F, Aaron S, Sara M, et al. HLA-DR and β<sub>2</sub> microglobulin expression in medullary and atypical medullary carcinoma of the breast: histopathologically similar but biologically distinct entities [J]. Journal of Clinical pathology, 2000, 53(23): 286-291.

[20] 徐雅莉,孙强. 乳腺癌高危因素[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(10): 1201-1212.

[21] 刘莉莉,陈亮,林永志,等. 血清 CA153、CA125 和 CEA 联合检测在乳腺癌诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 858-859.

[22] 郭满盈,罗媛焯,陈扬,等. 趋化因子受体 CCR6 及 CCR7 在乳腺癌组织上的表达及其意义[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 52(9): 9570-9574.

(收稿日期: 2010-09-12)