

• 论 著 •

金黄色葡萄球菌腺苷酰转移酶耐药基因的克隆及其原核表达^{*}

陈洪升¹, 周 帅², 陈吟霜², 谢永强², 张咏莉¹, 周珍文^{2△}

(1. 广东药学院, 广州 510224; 2. 广东省广州市妇女儿童医疗中心 510000)

摘要:目的 在大肠杆菌中克隆表达金黄色葡萄球菌氨基糖苷类耐药基因, 即腺苷酰转移酶基因, 为其功能研究奠定基础。
方法 按金黄色葡萄球菌腺苷酰转移酶蛋白编码序列设计引物, 以金黄色葡萄球菌基因组 DNA 为模板, 扩增腺苷酰转移酶基因, 所得片段与 pGEX-4t-1(+) 载体连接, 转化至感受态大肠杆菌 BL21(DE3), 提取质粒进行双酶切及测序鉴定, IPTG 诱导重组蛋白表达, SDS-PAGE 及 Western-blot 对重组蛋白作鉴定。**结果** 使用金黄色葡萄球菌基因组为模板, 成功扩增约 800 bp 目的片段, 重组质粒双酶切见目的片段, 测序显示腺苷酰转移酶基因长 783 bp, 始于 ATG, 止于 TAG, 预测的等电点和相对分子质量分别为 7.75 和 29×10^3 , 目的基因与 Genbank 腺苷酰转移酶同源性为 99%, SDS-PAGE 及 Western-blot 显示在 55×10^3 见重组蛋白表达。**结论** 在大肠杆菌中成功克隆表达了金黄色葡萄球菌腺苷酰转移酶基因。

关键词:金黄色葡萄球菌; 腺苷酰转移酶; 耐药基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)19-2667-03

Clone and prokaryotic expression of staphylococcus aureus drug resistance adenylyltransferase gene^{*}

CHEN Hongsheng¹, ZHOU Shuai², CHEN Yinshuang², XIE Yongqiang²,
ZHANG Yongli¹, ZHOU Zhenwen^{2△}

(1. Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou, Guangdong 510224, China; 2. Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: **Objective** To clone and express Staphylococcus aureus drug resistance adenylyltransferase gene in E. coli BL21, and to make the foundation for its function research. **Methods** Primers were designed on the basis of adenylyltransferase gene in genbank, PCR was used to amplify adenylyltransferase gene using Staphylococcus aureus genomic DNA as template. The obtained PCR production was attached with pGEX-4t-1(+) plasmid, and transformed into E. coli BL21 (DE3). The recombinant plasmid was digested by double enzyme digestion and identified by gene sequence. The recombinant protein was induced to expression by IPTG and identified by Western-blotting. **Results** Using Staphylococcus aureus genome as a template, the target fragment about 800 bp was successful amplified. After enzyme-cutting and DNA-sequencing, the target fragment showed that the ORF begin with ATG, end with TAG, 783 bp in length, the predicted isoelectric point and molecular weight were 7.75 and 29×10^3 , and it was homology 99% homology with the reported sequence gene in genbank. SDS-PAGE and Western-blot showed the molecular weight of recombinant fusion protein was about 55×10^3 . **Conclusion** Adenylyltransferase gene of Staphylococcus aureus was successfully cloned and expressed in E. coli as a fusion protein, which makes the foundation for the research of its function.

Key words: Staphylococcus aureus; adenosine acyl transferase; drug resistance gene

金黄色葡萄球菌是机体化脓感染中最常见的病原菌, 随着氨基糖苷类药物的广泛应用, 耐药性日益严重。腺苷酰转移酶是一种跨膜多重药物外排蛋白, 介导葡萄球菌对氨基糖苷类药物及多种结构上近似甚至无关的药物耐药^[1-2]。本研究对腺苷酰转移酶基因进行克隆及原核表达, 为其功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 一般材料 金黄色葡萄球菌菌株(111123035)分离自广州市妇女儿童医疗中心内科病区, 11 岁儿童患者的全身多发软组织感染脓液。

1.2 仪器与试剂 上海力申公司 HF safe-1200 型生物安全柜, 德国 Biometra 公司 PCR, 英国 Uvitec 公司 GAS7508-T20 紫外凝胶成像分析系统, 德国 Sorvall 公司 micro 17R 台式高速冷冻离心机。pGEX-4t-1 质粒载体购自法国马来亚公司; 质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、rTaq DNA 聚合酶、EcoR I

和 XhoI I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶 DNA marker 等购自 Takara 公司。IPTG、丙烯酰胺、Tris 碱、预染蛋白 Marker 和 DAB 显色剂等购自鼎国生物公司。鼠抗 GST 标签单克隆抗体购自北京康为世纪生物有限公司。

1.3 方法

1.3.1 最低抑菌浓度(MIC) 按照美国临床和实验室标准化协会 2012 年发布的《抗微生物药物敏感试验的执行标准》, 采用琼脂 2 倍稀释法进行 MIC 检测。

1.3.2 腺苷酰转移酶基因 PCR 扩增 根据 GenBank 金黄色葡萄球菌腺苷酰转移酶基因序列(CP002120.1), 设计特异性引物 1 对。P1: 5'-CGC GAA TTC ATG AGC AAT TTG ATT AAC GG-3', P2: 5'-CGC CTC GAG CTA ATT GAG AGA AGT TTC TA-3'。引物序列分别加入 EcoR I、XhoI I 酶切位点。挑取金黄色葡萄球菌单菌落于 50 μL 水中, 煮沸

^{*} 基金项目: 广州市医药科技项目(20131A011053)。

作者简介: 陈洪升, 男, 在读硕士, 主要从事病原生物学研究。 △ 通讯作者, E-mail: 861636726@qq.com。

15 min, 12 000r/min 离心 1 min, 取上清液作为 PCR 模板。PCR 反应条件: 94 ℃ 热变性 5 min 后, 94 ℃ 变性 45 s, 53 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 34 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 15 min。

1.3.3 腺苷酰转移酶基因克隆至 pGEX-4t-1 表达载体 腺苷酰转移酶基因 PCR 产物纯化后, 经 EcoR I、XhoI 酶切纯化后, 与相同酶切的 pGEX-4t-1 质粒连接, 转化至大肠杆菌 BL21。挑取经氨苄霉素筛选的阳性菌落提取质粒进行 PCR 及双酶切鉴定。

1.3.4 腺苷酰转移酶基因在大肠杆菌 BL21/DE3 的诱导表达 将含有重组质粒的 BL21/DE3 工程菌接种至含氨苄霉素 (50 μg/mL) 的 LB 琼脂板, 培养过夜后挑单菌落于 LB 液体培养基中 (含氨苄霉素 50 μg/mL), 37 ℃ 培养至 OD 值 0.4 左右, 加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 30 ℃ 诱导表达 6 h, 8 000 r/min 4 ℃ 离心 20 min, 收集菌体, SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.3.5 重组蛋白 Western-blot 分析 重组蛋白表达产物经 12% SDS-PAGE 后转移至 PVDF 膜, 使用 HRP 标记的 GST 标签鼠单克隆抗体 (1 : 1 000 稀释), DAB 显色液显色。

2 结 果

2.1 氨基糖苷类抗菌药物的 MIC 金黄色葡萄球菌菌株 (111123035) 对庆大霉素、阿米卡星的 MIC 分别为 18、16 μg/mL。均为耐药。头孢西丁 MIC 值为 18 μg/mL, 该菌株为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株。

2.2 腺苷酰转移酶基因的 PCR 扩增 以 111123035 菌株基因组 DNA 为模板, PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在 800~1 000 bp 间见明显特异性条带, 与目的基因 (783 bp) 大小相似。见图 1。

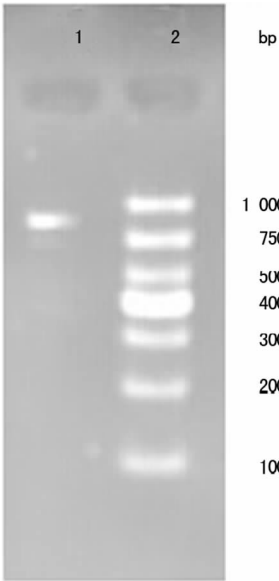
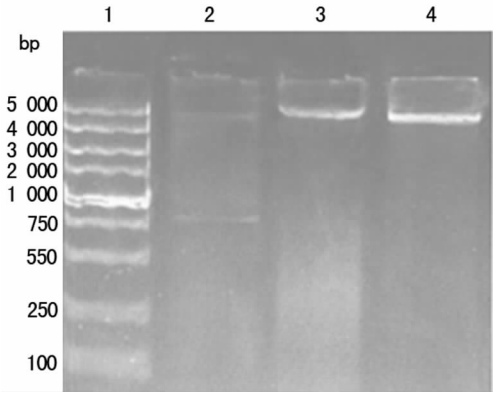


图 1 腺苷酰转移酶基因的 PCR 扩增

2.3 重组质粒的鉴定 从转化的大肠杆菌 BL21 提取的重组质粒, 经 EcoR I 和 XhoI 酶切后见目的条带。见图 2。测序显示腺苷酰转移酶基因长 783 bp, 起始于 ATG, 终止于 TAG, 预测的等电点为 7.75, 相对分子质量约为 29×10^3 , 与 GenBank 中编号为 NC_017341.1 的基因同源性为 99%。氨基酸比对结果显示仅见第 49 位氨基酸 D 改变为 Y。

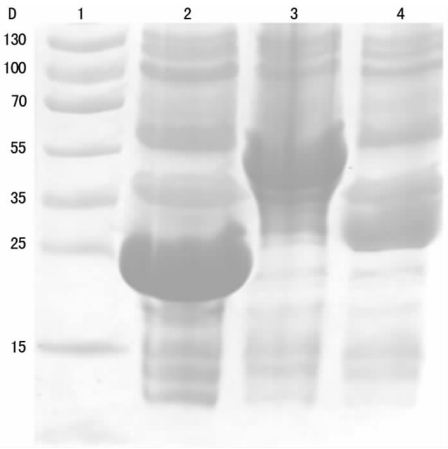
2.4 SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 0.5 mmol 的 IPTG 诱导 8 h 后, 重组菌体经 SDS-PAGE 电泳后, 在 55×10^3 可见明

显表达带, 这与融合重组蛋白的理论相对分子质量相符 (26×10^3 GST + 29×10^3 adenylyltransferase)。见图 3。



注: 1 表示 DNA 标记; 2 表示重组质粒双酶消化; 3 表示重组质粒; 4 表示双亲 pGEX-4T-1(+) 重组。

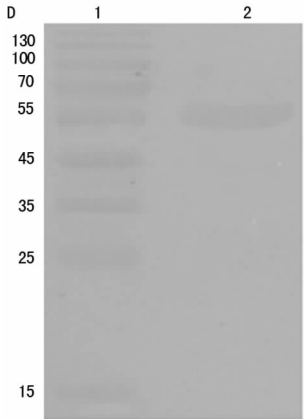
图 2 重组质粒双酶切鉴定电泳图



注: 1 表示蛋白质标记; 2 表示 pEGX-4T-1(+)/BL21(DE3) 诱导 IPTG; 3 表示质粒 pEGX-4T-1(+)-腺苷酰转移酶/BL21(DE3) 诱导 IPTG; 4 表示质粒 pEGX-4T-1(+)-腺苷酰转移酶/BL21(DE3) 无 IPTG 诱导。

图 3 重组腺苷酰转移酶 12% SDS-PAGE 电泳图

2.5 重组腺苷酰转移酶 Western-blot 分析鉴定 使用鼠抗 GST 标签单克隆抗体进行 Western-blot, 结果显示在 55×10^3 左右见目的蛋白。见图 4。



注: 1 表示蛋白质标记; 2 表示质粒 pEGX-4T-1(+)-腺苷酰转移酶/BL21 诱导。

图 4 重组蛋白表达产物 Western-blot 检测

3 讨 论

本研究从患者全身多发软组织感染脓液标本分离出 1 株高耐药菌株(111123035),为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,对庆大霉素、阿米卡星的 MIC 分别为 18、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,结果表明对氨基糖苷类药物高度耐药。对氨基糖苷抗菌药物耐药是因细菌产生氨基糖苷类双功能修饰酶(AA C(6')-APH(2"))钝化酶所致^[3-5]。该种耐药性的决定因子为 PSK-1 样质粒^[4]。Jordens 等研究报道金黄色葡萄球菌对庆大霉素的耐药性并非质粒携带,而是染色体携带。

有学者在大肠杆菌、酵母菌等进行了腺苷酰转移酶耐药基因的分离及鉴定,结果显示腺苷酰转移酶基因序列和蛋白相对分子质量与报道相符^[6-7]。本研究首次对金黄色葡萄球菌腺苷酰转移酶耐药基因进行克隆表达,从基因组扩增出的腺苷酰转移酶目的片段经双酶切与质粒载体 pGEX-4T-1(+)成功重组,测序结果表明目的基因片段与 GenBank 中金黄色葡萄球菌菌株腺苷酰转移酶基因的一致性高达 99.9%,仅第 145 位 T 碱基突变成 G 和第 274 位 G 碱基突变成 A,说明该基因具有高度保守性。

构建表达系统时选择了 pGEX 表达系统,该系统是目前广泛使用的一种融合蛋白表达系统,可用于表达和纯化,作为免疫原和生物、生化制剂的多肽,或构建 cDNA 表达文库^[8-10]。GST 标签体系具有蛋白表达产率高、表达产物纯化方便,以及有利于 GST 抗体制备等特点。GST 融合蛋白可溶于水溶液,可从细菌裂解液中提取,在不变性的条件下通过亲和层析得到。GST 融合蛋白可被位点特异性蛋白酶裂解,从而除去 GST 蛋白。融合蛋白又是一个良好的强免疫原,因此很容易制备抗新蛋白的抗体^[11-12]。本组实验结果显示,在 IPTG 的诱导下,重组表达质粒表达出约 55×10^3 的融合蛋白,其中腺苷酰转移酶蛋白约为 29×10^3 ,与由核苷酸序列推导的蛋白质相对分子质量大小相符。

本研究成功对染色体介导的氨基糖苷耐药基因腺苷酰转移酶进行了克隆和原核表达,获得腺苷酰转移酶蛋白,为进一步进行腺苷酰转移酶蛋白高级结构测定做好了准备,为了解腺苷酰转移酶蛋白的特性和功能及其对细菌耐药机制的深入研究奠定了基础^[13-14]。

参考文献

- [1] Borgundvaag B, Ng W, Rowe B, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in skin and soft tissue infections in patients presenting to Canadian emergency departments[J]. CJEM, 2013, 15(3): 141-160.
- [2] Hanessian S, Giguère A, Grzyb J, et al. Toward overcoming *staphylococcus aureus* aminoglycoside resistance mechanisms with a functionally designed neomycin analogue[J]. ACS Med Chem Lett, 2011, 2(12): 924-928.
- [3] Woegerbauer M, Zeininger J, Springer B, et al. Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes aph(3')-IIIa and aph(3')-IIa in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* and *Staphylococcus aureus* isolates in Austria[J]. J Med Microbiol, 2014, 63(Pt

- 2): 210-217.
- [4] Emaneini M, Bigverdi R, Kalantar D, et al. Distribution of genes encoding tetracycline resistance and aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a burn center[J]. Ann Burns Fire Disasters, 2013, 26(2): 76-80.
- [5] Hanessian S, Giguère A, Grzyb J, et al. Toward overcoming *staphylococcus aureus* aminoglycoside resistance mechanisms with a functionally designed neomycin analogue[J]. ACS Med Chem Lett, 2011, 2(12): 924-928.
- [6] Gou D, Liang L, Liu R, et al. Effect of overexpression of nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase on succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111[J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2012, 28(9): 1059-1069.
- [7] Emanuelli M, Carnevali F, Lorenzi M, et al. Identification and characterization of YLR328W, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding NMN adenylyltransferase. Expression and characterization of the recombinant enzyme[J]. FEBS Lett, 1999, 455(1/2): 13-17.
- [8] Guo JX, Wei HS, Song YJ, et al. Cloning and expressing of golgi protein73 gene fragment and preparation of monoclonal antibodies against the recombinant protein[J]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 2013, 27(4): 301-303.
- [9] Wang J, Li N, Shen Q, et al. Expression and identification of recombinant *Staphylococcus aureus* enterotoxin A[J]. Wei Sheng Yan Jiu, 2013, 42(6): 920-924.
- [10] Li RH, Hao HX, Wang HL, et al. Cloning and expression of actin gene of *Toxoplasma gondii*[J]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, 2013, 31(5): 352-355.
- [11] Huang X, Liu G, Hu X, et al. Expression and activity determination of recombinant capsid protein VP2 gene of enterovirus type 71[J]. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2014, 48(4): 324-327.
- [12] Liu Q, Xu XN, Zhou Y, et al. Molecular cloning and characterization of a novel *Clonorchis sinensis* antigenic protein containing tandem repeat sequences[J]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, 2013, 31(4): 245-250.
- [13] Gao JS, Wu W, Hou HL, et al. Cloning and prokaryotic expression of casein kinase II subunit beta gene fragment of *Dirofilaria immitis*[J]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, 2013, 31(4): 290-292.
- [14] Wu G, Wang G, Ji J, et al. Cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase gene from *Lycium chinense* Mill. and enhanced salt tolerance by overexpressing in tobacco[J]. Gene, 2014, 543(1): 85-92.