

## 三株产 CTX-M 型超广谱 $\beta$ -内酰胺酶 大肠埃希菌的研究

殷俊 程君 孙震 张晓妮 高帆 朱玉林 叶英 李家斌

**【摘要】 目的** 探讨3株产CTX-M型超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBLs)的大肠埃希菌分子生物学特征的改变及其与该突变位点的关系。**方法** 3株产CTX-M型ESBLs的大肠埃希菌于2005年收集自安徽省内3家医院。克隆这3株细菌的突变基因后进行序列分析,测定野生株、转移接合子与克隆子的最低抑菌浓度,提取突变基因所编码的蛋白质,进行等电聚焦电泳和酶动力学检测,并使用脉冲场凝胶电泳分析这3株细菌的同源性。**结果** PCR和序列分析结果显示,与CTX-M-14相比,这3株大肠埃希菌的编码产物各有2处氨基酸突变,1株为第77位丙氨酸(Ala)突变为缬氨酸(Val)、第167位脯氨酸(Pro)突变为亮氨酸(Leu)(等电点为9.1);另2株均为第77位Ala突变为Val、第272位丝氨酸(Ser)突变为精氨酸(Arg)(等电点为9.3)。最低抑菌浓度和酶动力学检测结果表明,这两种酶均可高度水解头孢噻肟。脉冲场电泳结果提示这3株细菌无同源性。**结论** 本研究发现了2种新的分离自大肠埃希菌的CTX-M酶,探讨突变位点与其生物学性状改变的关系,为遏制耐药基因及研究新的抗菌药物作用靶点提供依据,具体机制需进一步深入研究。

**【关键词】** 大肠埃希菌;超广谱 $\beta$ -内酰胺酶;耐药性

**Study on three strains of *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of CTX-M type** YIN Jun, CHENG Jun, SUN Zhen, ZHANG Xiao-ni, GAO Fan, ZHU Yu-lin, YE Ying, LI Jia-bin. Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Corresponding author: LI Jia-bin, Email: lijiaabin948@vip.sohu.com

**【Abstract】 Objective** To describe the molecular characteristics of two novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) of CTX-M type. **Methods** Three strains of *Escherichia coli* producing ESBLs of CTX-M type were collected from three hospitals of Anhui Province in 2005. Minimal inhibitory concentrations were detected by agar dilution method. Molecular characterization was carried out through polymerase chain

reaction, single-strand conformation polymorphism, automated sequencing, clone and kinetic parameters and isoelectric focusing. Genetic relatedness was determined by pulsed-field gel electrophoresis. **Results** PCR and DNA sequencing revealed that two novel ESBLs, one with deduced amino acid sequence that different from CTX-M-14 by the substitutions Ala77→Val and Pro167→Leu (with pI 9.1); the other by the substitutions Ala77→Val and Ser 272→Arg (with pI 9.3). Both had potent hydrolytic activity against cefotaxime. Enzymatic studies revealed that the two novel ESBLs had no homology. **Conclusions** The study found two novel ESBLs of CTX-M type from *Escherichia coli*, exploring the mutation and the biological characteristics in order to curb the spread of resistance genes and provide new antibacterial drug targets, and revealing the specific mechanisms need further study.

**【Key words】** *Escherichia coli*; Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases; Antimicrobial susceptibility

第三代头孢菌素广泛应用于临床抗感染治疗,但带来了严重问题:在各级医院中,革兰阴性菌 CTX-M 型超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)的检出率已呈逐年上升趋势。本研究通过检测 3 株携带有突变 CTX-M 基因的大肠埃希菌(*E. coli* p168、*E. coli* p517 和 *E. coli* p667),探讨其生物学性状,明确其耐药表型与基因型的关系。

## 材料和方法

### 一、菌株来源

*E. coli* p168 分离于安徽省淮北市人民医院胸外科 1 例 43 岁女性食道癌患者的创口分泌物标本,*E. coli* p517 分离于安徽医科大学第一附属医院 ICU 病房 1 例 65 岁男性肾衰竭患者的血液标本,*E. coli* p667 分离于安徽省立医院烧伤科 1 例 59 岁男性呼吸衰竭患者的血液标本。3 株细菌均经 MicroScan WalkAway-40 全自动鉴定仪(Dade Behring, USA)鉴定。质控菌株为 *E. coli* ATCC25922 和 *E. coli* ATCC35218,均由安徽省细菌耐药性监控中心保存。

### 二、抗菌药物及试剂

哌拉西林(Piperacillin, PIP)、头孢噻肟(cefotaxime, CTX)、头孢曲松(ceftriaxone, CRO)、头孢他啶(ceftazidime, CAZ)、氨曲南(aztreonam, ATM)、左氧氟沙星(levofloxacin, LVX)等抗菌药物均购于中国药品生物制品检定所。Mueller-Hinton (M-H)培养基、琼脂粉、酵母粉、胰蛋白胨等均购于英国 Oxoid 公司。限制性内切酶、聚合酶链反应及克隆所用试剂均购于大连宝生物制品有限公司。

### 三、实验器材

电热恒温培养箱(上海精宏公司)、低温离心机(德国 Hettich)、恒温摇床(江苏国胜仪器厂)、凝胶成像系统(天能科技有限公司)、PCR 仪(德国 Biometra)、电泳仪(北京市六一仪器厂)、CHEF-Mapper XA 型脉冲电泳仪(美国 BioRad)等。

#### 四、质粒转移接合试验

*E. coli* p168、*E. coli* p517 和 *E. coli* p667 为试验供体菌,使用 *E. coli* C<sub>600</sub> (对链霉素耐药)为受体菌。供体菌和受体菌各 109 CFU/ml 置于 LB 培养基,37℃ 孵育过夜,使用 500 μg/ml 链霉素和 10 μg/ml 头孢噻肟 LB 琼脂培养基筛选产 CTX-M 酶的接合子。

#### 五、聚合酶链反应(PCR)

PCR 反应体系为 50 μl,包括 *ExTaq* 酶 0.25 μl (1.25 U)、10 × PCR Buffer 5 μl、dNTP 4 μl (0.2 mmol/L)、引物各 1 μl、模板 20 ~ 100 ng,加双蒸水至 50 μl。设 *E. coli* ATCC25922 为阴性对照,各组标准产酶株为阳性对照,检测的 ESBLs 型别及引物序列(表 1)。

表 1 CTX-M 组通用引物

CTX-M 型 ESBLs	引物	引物序列(5'→3')	产物(bp)
CTX-M-1	CTX-M-1-F	ACAGCGATAACGTGGCGATG	216
	CTX-M-1-R	TCGCCCCAATGCTTTACCCAG	
CTX-M-2	CTX-M-2-F	TGGAAGCCCTGGAGAAAAGT	163
	CTX-M-2-R	CTTATCGCTCTCGCTCTGTT	
CTX-M-8	CTX-M-8-F	ACTTCAGCCACACGGATTCA	877
	CTX-M-8-R	CGAGTACGTCACGACGACTT	
CTX-M-9	CTX-M-9-F	CTGCTTAATCAGCCTGTGGA	229
	CTX-M-9-R	TCAGTGGATCCAGACGAAA	
CTX-M-25	CTX-M-25-F	CCGATAACACGCAGACGC	480
	CTX-M-25-R	CCTTTCAGCCACATCACCAG	
CTX-M-1T	CTX-M-1T-F	GGCCCATGGTTAAAAAATCACTGC	890
	CTX-M-1T-R	CCGTTTCCGCTATTACAAACCGTTG	
CTX-M-9T	CTX-M-9T-F	TTGAATTGCGCATGCTGACAAAGAGAGTGCAA	875
	CTX-M-9T-R	TTGGATCCGTTACAGCCCTTCGGCGATGATTC	

#### 六、目的基因克隆及表达

提取转移接合子的质粒 DNA 为模板,使用引物 CTX-M-9T 扩增获得全编码目的基因,该序列在上下游引物的 5'-端分别加上 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切位点。将 PCR 产物凝胶回收后克隆入 pGEM-Teasy 载体,表达于感受态细胞 *E. coli* DH5α 中。提取重组菌质粒 DNA 为模板,扩增目的基因,双脱氧链终止法测定核苷酸序列,结果与 GenBank 中相应序列进行比对,确定该 *Amp* C 酶的基因型。提取重组菌质粒后用 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切,将新基因型全编码基因克隆入表达载体 pHSG398,转化入感受态细胞 *E. coli* JM109。

#### 七、药敏试验测定最低抑菌浓度

琼脂稀释法测定 15 种抗菌药物对 3 株大肠埃希菌的野生株、接合子及重组菌的最低抑菌浓度(minimal inhibition concentration, MICs)。根据 2008 年临床与实验室标准(clinical and laboratory standards institute, CLSI)读取细菌 MICs 值,质控细菌为 *E. coli* ATCC25922 和 *E. coli* ATCC35218。

## 八、等电聚焦电泳测定等电点

超声破碎法提取3株大肠埃希菌重组菌的酶粗制液,进行等电聚焦电泳,结合标准产酶株的结果,按照标准曲线,分析该重组菌所表达酶的等电点。

## 九、酶的动力学特性

获得酶粗提液后,检测酶对不同抗菌药物的水解反应。每种抗菌药物首次检测选择最适波长(200~400 nm 进行扫描,将空白管和试验管之间吸光度差值最大的波长确定为该种抗菌药物的分析波长),在37℃采用紫外分光光度计法测定一定波长不同浓度下吸光度随时间的变化,Lineweaver-Burk 作图法测定  $K_m$ 。

## 十、脉冲场凝胶电泳

将培养过夜的细菌用低熔点胶灌模,蛋白酶 K 消化 24 h,限制性内切酶 *Xba* I (40 U) 37℃ 酶切 24 h。使用 CHEF-Mapper XA 型脉冲电泳仪,电压 6 V/cm,夹角 120°,脉冲参数 5~35 s, (22 h, 14℃), EB 染色 20 min, 拍照。

# 结 果

## 一、质粒转移接合试验

抗菌药物平板3次传代后,筛选出接合子。将野生株与接合子使用碱裂解法提取质粒后,使用 CTX-M-9T 进行目的基因扩增,可见相同大小的条带。

## 二、PCR 和目的基因克隆与基因序列分析

分别提取 *E. coli* p168、*E. coli* p517 和 *E. coli* p667 质粒 DNA 后扩增编码 CTX-M 酶的全编码基因,成功克隆入 pGEM-Teasy 载体,表达于感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$  中。经基因序列分析后至 GenBank 比对以证明这些基因片段编码 CTX-M-14 型 ESBLs。确认 *E. coli* p168 所携带的 CTX-M 基因编码的酶有 2 个位点突变,其中第 77 位氨基酸由 Ala 变为 Val,第 167 位氨基酸由 Pro 变为 Leu;*E. coli* p517、*E. coli* p667 所携带的 CTX-M 基因编码的酶突变相同,也有 2 个突变位点,其中第 77 位氨基酸由 Ala 变为 Val,第 272 位氨基酸由 Ser 变为 Arg。该序列已在 GenBank 注册,其序列授权号为分别为 EU545409 和 EU545410。

## 三、药敏实验及酶动力学检测结果

*E. coli* p168、*E. coli* p517 和 *E. coli* p667 的野生株、接合子、重组菌均对哌拉西林、头孢噻肟、头孢曲松高度耐药( $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ ) (表 2)。酶动力学结果提示这 2 种新基因编码的 ESBLs 对头孢噻啶、头孢呋辛及头孢噻肟有较高的水解效率 (表 3)。

## 四、等电聚焦电泳结果

使用头孢硝噻吩染色后,在标准曲线上与标准产酶株对照,计算得 2 种新酶的等电点分别为 9.1 (*E. coli* p168) 与 9.3 (*E. coli* p517、*E. coli* p667)。

## 五、脉冲场凝胶电泳

当脉冲场凝胶电泳中电泳条带不一致的条带数 $\geq 3$ 条时,则判定电泳菌株之间没有同源性。如图 1 所示,*E. coli* p168、*E. coli* p517 和 *E. coli* p667 的电泳条带比较发现这 3 株细菌之间无同源性。

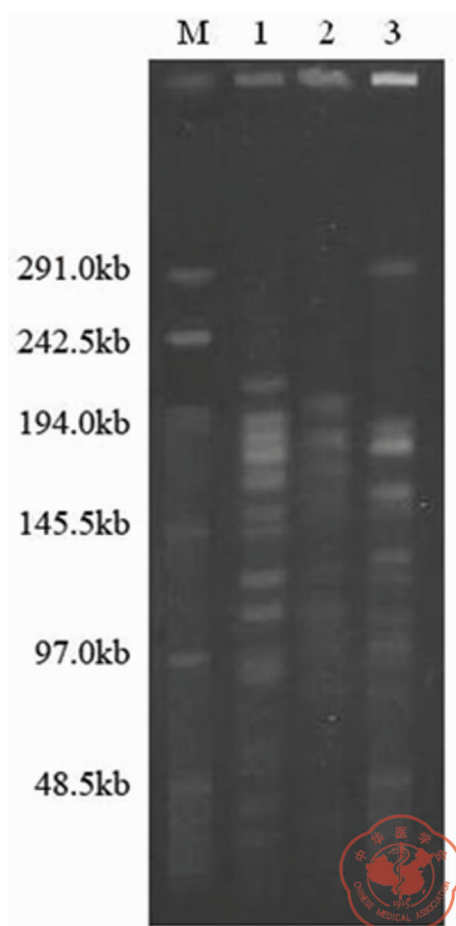


图1 3株产CTX-M型ESBLs的大肠埃希菌的脉冲场电泳

M:标记物;1:*E. coli* p168;2:*E. coli* p517;3:*E. coli* p667

表2 3株产CTX-M型ESBLs的大肠埃希菌野生株和接合子及重组菌对15种抗菌药物的最低抑菌浓度

菌株	MIC (μg/L)														
	PIP	TZP	CTX	CRO	CAZ	FEP	FOX	ATM	IPM	MEM	LVX	CIP	GAT	AMK	GEN
<i>E. coli</i> p168	>512	32	64	128	>128	16	8	8	1	1	16	16	2	4	16
<i>E. coli</i> p517	>512	64	>128	>128	128	128	16	8	1	1	32	>16	>32	4	>64
<i>E. coli</i> p667	>512	8	>128	>128	8	16	4	4	1	1	8	8	16	16	>64
<i>E. coli</i> p168 接合子	>512	8	64	64	>128	8	8	4	0.50	0.50	2	2	2	1	4
<i>E. coli</i> p517 接合子	256	8	128	64	>128	16	16	4	0.25	0.25	4	32	4	4	>64
<i>E. coli</i> p667 接合子	512	4	>128	>128	8	16	4	4	0.50	0.50	2	8	8	8	16
<i>E. coli</i> p168 重组菌	>512	2	64	64	8	16	8	4	0.25	0.25	1	1	2	2	1
<i>E. coli</i> p517 重组菌	256	2	128	64	8	16	16	2	0.25	0.25	1	2	2	1	4
<i>E. coli</i> p667 重组菌	256	4	>128	>128	8	16	4	1	0.50	0.25	2	4	2	1	1

表3 2种新酶对6种抗菌药物的酶动力学参数

抗菌药物	GenBank 编号	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu mol/L$ )	$k_{cat}/K_m$	相对 $k_{cat}/K_m$
青霉素	EU545409	$1100 \pm 45$	$49 \pm 5.6$	22.4	100
	EU545410	$2100 \pm 80$	$41 \pm 3.2$	51.2	100
头孢噻啉	EU545409	$1600 \pm 45$	$116 \pm 6.5$	13.8	62
	EU545410	$2300 \pm 110$	$164 \pm 4.4$	14.0	27
头孢呋辛	EU545409	$3500 \pm 150$	$443 \pm 24$	7.9	35
	EU545410	$4700 \pm 40$	$460 \pm 32$	10.2	20
头孢噻肟	EU545409	$1300 \pm 30$	$52 \pm 4.3$	25.0	112
	EU545410	$950 \pm 140$	$35 \pm 3.2$	27.1	53
氨曲南	EU545409	$< 0.01$	$460 \pm 46$	$< 0.01$	$< 0.01$
	EU545410	$< 0.01$	$320 \pm 15$	$< 0.01$	$< 0.01$
头孢吡肟	EU545409	$< 0.01$	$0.52 \pm 0.12$	$< 0.02$	$< 0.01$
	EU545410	$< 0.01$	$0.84 \pm 0.09$	$< 0.02$	$< 0.01$

## 讨 论

1986年,日本学者从实验动物体内分离出了一株能产生ESBLs的大肠埃希菌,该ESBLs对头孢噻肟具有强水解作用,并被命名为FEC-1<sup>[1]</sup>。1989年,Bauemfeind等<sup>[2]</sup>从临床患者体内分离出了一种同样对头孢噻肟有高水解活性,并有较高等电点(pI为8.9)的ESBLs,命名为CTX-M-1。此后,ESBLs在阿根廷、日本也相继发现,尤其多见于南美、东欧、东亚等国家和地区。CTX-M型ESBLs按照核苷酸序列的相似程度分为4类,第一类:CTX-M-1、-3、-10、-11、-12、-15、-22、-23、-28、-29、-30和-33;第二类:CTX-M-2、-4、-5、-6、-7、-20和Toho-1;第三类:CTX-M-9、-13、-14、-16、-17、-18、-19、-21、-24、-27和Toho-2;第四类:CTX-M-8、-25和-26。目前世界上主要的流行型别为CTX-M-2、-3和-14,但各国各地区之间存在差异。美国以CTX-M-2多见,近2年CTX-M-5逐渐成为欧洲局部暴发的最流行型别,而CTX-M型ESBLs在我国分布并不均匀,全国范围内主要的流行亚型为CTX-M-3和CTX-M-14。在我国,CTX-M型ESBLs越来越多地被发现,Chanawong等<sup>[3]</sup>报道了在中国发现CTX-M-13和CTX-M-14型ESBLs,Cheng等<sup>[4]</sup>报道了我国出现CTX-M-46型ESBLs,产CTX-M型酶的革兰阴性杆菌已成为医院感染的流行菌,也是医院感染治疗的重点和难点。

本研究中3株大肠埃希菌的野生株、接合子和重组菌的MICs结果接近,对哌拉西林、头孢噻肟、头孢曲松均有耐药性( $\geq 64 \mu g/ml$ ),与CTX-M型耐药表型相符。野生株的耐药性略高于接合子及重组菌,尤其对头孢他定,*E. coli* p168和*E. coli* p517都达到了耐药标准,故而考虑这3株细菌还存在其他耐药机制,如靶位改变、孔蛋白丢失以及携带其他编码抗菌药物水解酶的基因(如Amp C)等,将行进一步研究。

这2种新酶的等电点分别为9.1和9.3,与CTX-M-14的等电点(8.1)有较大的差异(<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>)。酶动力学分析也显示这2类新的CTX-M酶对头孢噻肟的水解率较高,与CTX-M-14的分子生物学特征接近,但略高于CTX-M-14,此结果与药敏结果相符。脉冲场电泳提示这些细菌间



没有同源性,它们之间不存在水平克隆传播。

CTX-M 型 ESBLs 氨基酸序列中,第 104 位天冬酰胺、第 132 位天冬酰胺、第 160 位苯丙氨酸、第 167 位脯氨酸、第 232 位甘氨酸、第 237 位丝氨酸和第 276 精氨酸是重要的活性位点。其中第 167 位脯氨酸位于决定水解活性的  $\Omega$  环<sup>[5]</sup>,所以当该处氨基酸残基发生突变时,通常会导致其分子生物学特征改变,如脯氨酸突变为丝氨酸,分子间的作用力发生变化,分子构象发生改变,活性中心空间变大,对头孢他定的水解效率大大增加。本研究中,*E. coli* p168 所产的 CTX-M 型 ESBLs 的第 167 位氨基酸发生了改变,由脯氨酸变为亮氨酸,对菌株的表型产生了一定影响,故推测此突变并非中性突变,而是在一定程度改变了  $\Omega$  环的空间构象。*E. coli* p517 和 *E. coli* p667 所产的 CTX-M 型 ESBLs 虽然在  $\Omega$  环处没有改变,但是其靠近第 276 位精氨酸活性位点第 272 位氨基酸由丝氨酸变为精氨酸,故而推测由于空间位置接近,第 276 位氨基酸的改变也影响了分子间的作用力,使底物与活性中心的结合力发生了变化,从而导致耐药表型的改变,也将对该方面行进一步研究。

本研究通过检测 3 株携带突变 CTX-M 型基因的大肠埃希菌,了解其表型及生物学特性,探讨突变位点与其生物学性状改变的关系,为遏制耐药基因及研究新的抗菌药物作用靶点提供科学理论依据。

## 参 考 文 献

- 1 Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*,2004,48: 1-14.
- 2 Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*,1990, 18:294-298.
- 3 Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, et al. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother*,2002,46:630-637.
- 4 Cheng J, Ye Y, Wang YY, et al. Phenotypic and molecular characterization of 5 novel CTX-M enzymes carried by *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Acta Pharmacol Sin*,2008,29:217-225.
- 5 Bae IK, Lee BH, Hwang HY, et al. A novel ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-54, with a single amino acid substitution at position 167 in the omega loop. *J Antimicrob Chemother*,2006,58:315-319.
- 6 Lewis JS 2nd, Herrera M, Wickes B, et al. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U. S. healthcare system. *Antimicrob Agents Chemother*,2007,51:4015-4021.
- 7 Delmas J, Chen Y, Prati F, et al. Structure and dynamics of CTX-M enzymes reveal insights into substrate accommodation by extended-spectrum beta-lactamases. *J Mol Biol*,2008,75:192-201.

(收稿日期:2008-11-06)

(本文编辑:孙荣华)

殷俊,程君,孙震,等.三株产 CTX-M 型超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌的研究[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(2):120-126.