

文章编号:2095-7386(2023)03-0041-05

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2023.03.006

eptC 过表达对沙门氏菌多粘菌素抗性的影响

蒋慧芬,张彤彤,卢晓萍,李 睿

(武汉轻工大学 生命科学与技术学院,武汉 430023)

摘 要:沙门氏菌耐药性严重危害公共卫生。沙门氏菌 A7 不携带多粘菌素耐药基因 *mcr*,但对多粘菌素 B 高耐药。将沙门氏菌 A7 *eptC* 基因全长克隆到 pGEM-T Easy 载体,测序验证无误后,经双酶切构建 pkk223-*eptC* 原核表达载体,分别转化 *E. coli* DH5 α 、沙门氏菌多粘菌素敏感株 NC28 和低耐药株 NC141,并测定重组菌的多粘菌素耐药性以及生物膜。结果显示,重组菌对多粘菌素的耐药性均无变化,生物成膜能力均有提高,其中 NC141 重组菌生物成膜能力有显著提升。*eptC* 基因过表达可以增加菌株的生物膜成膜能力,但并不能影响多粘菌素 B 耐药性。所做研究为沙门氏菌多粘菌素耐药性的机制研究提供理论依据。

关键词:沙门氏菌;*eptC*;多粘菌素抗性;生物膜

中图分类号:R 378.2⁺2

文献标识码:A

The effect of overexpression of *eptC* on polymyxin resistance of *Salmonella*

JIANG Hui fen, ZHANG Tongtong, LU Xiaoping, LI Rui

(School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: The antibiotic resistance of *Salmonella* poses a serious threat to public health. Polymyxin is known as the "last line drug" for the treatment of infections caused by Gram negative bacteria. The mechanism of polymyxin resistance of *Salmonella* remains unknown. *Salmonella* strain A7 does not carry the polymyxin resistance gene *mcr*, but is highly resistant to polymyxin B. The full length of *eptC* gene of A7 was amplified and cloned onto the pGEM-T Easy vector. Then the pkk223-*eptC* expression vector was constructed through double-enzyme digestion. The expression vector was converted into *E. coli* DH5 α , polymyxin sensitive strain NC28 and low resistance strain NC141, separately. The recombinant bacteria were determined the polymyxin MIC value and biofilm. The results showed that the polymyxin resistance of the recombinant strain remained unchanged. However, the biofilm forming ability was improved, especially for strain NC141, which increased biofilm formation significantly. Overexpression of the *eptC* gene can increase the biofilm formation, but would not affect polymyxin B resistance. This article provides new information for understanding polymyxin resistance of *Salmonella*.

Key words: *Salmonella*; *eptC*; polymyxin resistance; biofilm

收稿日期:2023-05-15.

作者简介:蒋慧芬(2001-),女,硕士研究生,E-mail:993237578@qq.com.

通信作者:李睿(1972-),女,教授,博士,E-mail:liruiwuhan@163.com.

基金项目:江西省市场监督管理局科技计划项目(GSJK202104).

1 引言

多粘菌素是一类多肽类抗生素,自 1959 年被多个国家应用于临床治疗与畜牧业生产中^[1]。多粘菌素在临床治疗中一般不是首选药物,而是人类抗生素治疗革兰氏阴性菌的最后一道防线^[2]。多粘菌素的抗菌作用并未完全明确,已知其与细菌外膜相互作用后,其“头部”与脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的脂质 A 相互作用,多粘菌素将自身正电荷残基添加到 LPS 中从而使 LPS 的稳定性降低,使细菌外膜遭到破坏,从而发挥抑菌的作用^[3]。多粘菌素耐药性机制比较复杂,目前仍不明确,大多认为与 LPS 修饰有关。L-Ara4N 或 PEtn 对 LPS 进行共价修饰,减少了 LPS 的净负电荷,致使细菌与带正电荷的多粘菌素 B 静电相互作用降低^[4]。

细菌携带多粘菌素耐药基因 *mcr* 时,该基因编码的乙醇胺转移酶可以将 pEtn 转移到 LPS 的脂质 A 上,降低多粘菌素与 LPS 的静电作用,从而导致细菌对多粘菌素耐药^[5]。目前已经发现了 10 种 *mcr* 基因^[6]。*mcr* 基因已在各种来源的细菌中被检出,也可在不同细菌中传播。*eptC* 基因编码的 EptC 是一种乙醇胺转移酶,可以对 LPS 和 LOS(lipooligosaccharide, 脂寡糖)的脂质 A、LPS 的核心多糖(core oligosaccharide, OS)、鞭毛杆蛋白 FlgG 等进行 pEtN 修饰^[7]。

沙门氏菌属是一种常见的革兰氏阴性致病菌,是细菌性疾病的重要致病因子之一^[8]。沙门氏菌多粘菌素耐药率近年来逐渐上升。陈富珍等对大理鸡源沙门氏菌进行耐药检测,发现分离得到的 6 株沙门氏菌均对多粘菌素 B 耐药^[9]。因此沙门氏菌多粘菌素耐药机制的研究是很有必要的。

本实验室在前期研究中发现部分多粘菌素耐药菌株在 *eptC* 基因上均存在共同的 SNP 突变位点,这可能是导致多粘菌素耐药的原因。在本文中,我们选用其中一株不含 *mcr* 基因且对多粘菌素 B 高耐药的沙门氏菌 A7,研究 *eptC* 基因过表达对重组菌的耐药性及生物膜的影响,为多粘菌素耐药机制提供理论基础。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株和质粒

沙门氏菌 A7、沙门氏菌 NC28、沙门氏菌 NC141 均分离自食品样本。大肠杆菌 DH5 α 、

pkk223 载体为本实验室保存,pGEM-T Easy 载体购于 Promega(上海)生物技术有限公司。

2.1.2 主要试剂及培养基

多黏菌素 B 硫酸盐粉末(USP 级),上海源叶生物科技有限公司;IPTG 溶液、X-Gal 溶液,上海生工生物工程公司;EcoR I 内切酶、Hind III 内切酶、TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 4.0,宝日医生物技术(北京)有限公司;肉汤培养基(MH),青岛海博生物技术有限公司。

2.2 主要实验仪器

PCR(Polymerase Chain Reaction)基因扩增仪(T100 型,Bio-Rad 生命科学产品(上海)公司);电泳仪基础电源(DYY-2C 型,北京六一生物科技有限公司);立式压力蒸汽灭菌器(YXQ-75SII 型,上海博迅实业有限公司);自动凝胶成像仪(GBOX-H12-E-M 型,英国 Syngene 集团)。

2.3 实验方法

2.3.1 引物设计

根据菌株 A7 的 *eptC* 基因全序列,用 Primer 5.0 设计全长引物以及菌落 PCR 验证引物。引物设计完毕后,用 Oligo7 软件检测评价。将引物序列送去上海生工生物有限公司合成。*eptC* 基因全长扩增上游引物为:5' GAATTCCCGCCCTCACG-CAGTTATGT 3',下游引物为:5' AAGCT-TCGGGCAACATACAGGCTATT 3'。目的片段为 1958 bp。菌落 PCR 上游引物序列为:5'CTGG-GAACGCACATTAAATAC 3',下游引物序列为:5'CGTAGGCATCATAGGTCAGG3'。目标产物为 439 bp。

2.3.2 表达载体的构建

以 A7 菌株基因组为模板,用全长引物扩增 *eptC* 基因。PCR 反应条件:预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,退火 58.8 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,循环 30 次,最后延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 扩增产物电泳后使用 TaKaRa 胶回收试剂盒回收产物。

用 T4DNA 连接酶将扩增的 *eptC* 片段与载体 pGEM-T Easy 连接,用热击法将连接产物转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,涂布在 Amp 抗性的 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。蓝白斑筛选挑取阳性重组菌,菌落 PCR 进一步验证。PCR 反应条件为:预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min;变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,退火 56.6 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,循环 35 次;最后延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。将阳性重组菌接种于含 Amp 的 LB 液体

培养基中,37℃过夜。用 TaKaRa 质粒提取试剂盒提取质粒。*EcoR* I 单酶切过夜,然后琼脂糖凝胶电泳进一步验证 *eptC* 基因是否插入到 pGEM-T Easy 载体。将重组质粒送往上海生工生物有限公司测序。分析 *eptC* 基因在 PCR 扩增过程是否复制无误,是否存在突变位点。

将宿主菌培养过夜并提取 pkk223 质粒,将 pGEM-T Easy-*eptC* 重组质粒和 pkk223 质粒分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切,37℃酶切过夜。并用琼脂糖凝胶电泳检测条带大小,条带确认后正确后进行切胶回收纯化,并取纯化产物再次电泳检测无误后,用 T4DNA 连接酶将 *eptC* 基因全长与载体 pkk223 连接过夜。

2.3.3 表达载体的转化

将构建的 pkk223-*eptC* 表达载体通过热击法分别转入 *E. coli* DH5 α 、沙门氏菌 NC28、沙门氏菌 NC141 中,进行蓝白斑筛选,在平板上挑取白斑单菌落,提取质粒,PCR 验证转化是否成功,并将重组菌在 Amp 抗性 LB 平板上划线保存菌种。

2.3.4 重组菌多粘菌素 B 耐药性检测

将含有 pkk223-*eptC* 重组质粒的重组菌接种于 MH 肉汤培养基于摇床中 37℃过夜培养 12 h 备用。参照 CLSI-M100-2019 标准,使用肉汤微量稀释法对含有 pkk223-*eptC* 重组质粒的重组菌进行多粘菌素 B 的 MIC 值测定。配制浓度为 1 024 μ g/mL 多粘菌素 B 溶液,MH 肉汤培养基梯度稀释分别配置成 256 μ g/mL、128 μ g/mL、64 μ g/mL、32 μ g/mL、16 μ g/mL、8 μ g/mL、4 μ g/mL、2 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.25 μ g/mL、0.125 μ g/mL 梯度的抗生素溶液。

利用浊度仪调节菌液浓度至 0.5 麦氏单位,取 50 μ L 抗生素按照高浓度到低浓度的顺序依次加入到无菌 96 孔板中,再依次取 50 μ L 稀释后菌液加入到 96 孔板中,阴性对照为 100 μ L MH 培养基,阳性对照为 50 μ L 稀释菌液加 50 μ L MH 培养基。不同抗生素的不同浓度梯度做三个平行对照。将加样完毕的 96 孔板于 37℃生化培养箱中静置培养 16~20 h。培养完毕后观察结果,以在小孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC 值。

2.3.5 重组菌生物膜检测

从斜面分别接种各菌于 TSB 培养基中,37℃,150 r/min 过夜培养。分别取各菌液在分光光度计

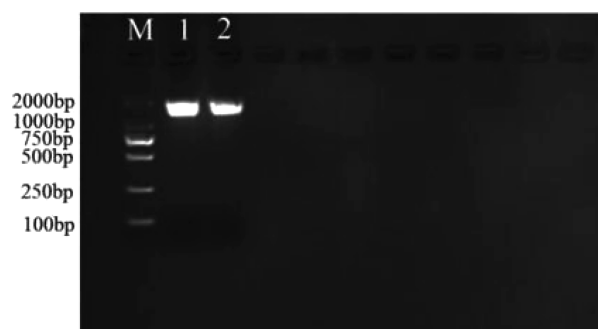
下测定 OD600 的值,并用新鲜的 TSB 培养基菌液调节 OD600 到接近 1。取配制好的稀释菌悬液及阴性对照加入 96 孔培养板中。在生化培养箱中 28℃静置培养 72 h。孵育完成后用酶标仪测定 OD570 吸光值,洗涤风干后加入 250 μ L 95%乙醇,抽提多余染料。将染液吸出到一个干净的酶标板,测定 OD570 值。每个样品测定 6 个平行对照孔,取平均值,并计算标准差 SD。

3 结果与分析

3.1 表达载体的构建

沙门氏菌 A7 菌株多粘菌素 MIC 值为 32 μ g/mL,属于多粘菌素高耐药菌株。扩增沙门氏菌 A7 菌株 *eptC* 基因全长并纯化,片段大小约为 1 958 bp,如图 1 所示。将 *eptC* 基因克隆到载体 pGEM-T Easy 上,转化 *E. coli* DH5 α ,筛选出白斑,进行菌落 PCR 验证重组菌,目的片段大小约为 439 bp,如图 2 所示。挑取阳性菌落,用 TaKaRa 质粒提取试剂盒提取重组菌的质粒,然后进行单酶切,一条目的片段大小约为 1 958 bp,另一条目的片段大小约为 3 015 bp,如图 3 所示,说明 *eptC* 基因是插入到了 pGEM-T Easy 载体上。送重组质粒进行测序,结果证实重组菌和沙门氏菌 A7 菌株 *eptC* 基因序列一致,可以进行后续的实验。

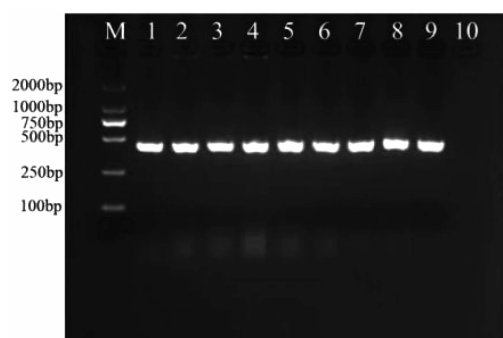
使用质粒提取试剂盒提取 pkk223 质粒,将 *eptC*-pGEM-T Easy 和 pkk223 载体分别进行双酶切,结果如图 4 所示。将目的片段切胶回收纯化,用 T4DNA 连接酶将 *eptC* 基因全长与载体 pkk223 连接过夜,构建 pkk223-*eptC* 表达载体。



M:DL 2000 DNA Maker;

泳道 1—2:A7 菌株 *eptC* 基因扩增产物

图 1 A7 菌株 *eptC* 基因 PCR 扩增产物纯化结果
Fig. 1 Purification results of PCR amplification products of the *eptC* gene of strain A7



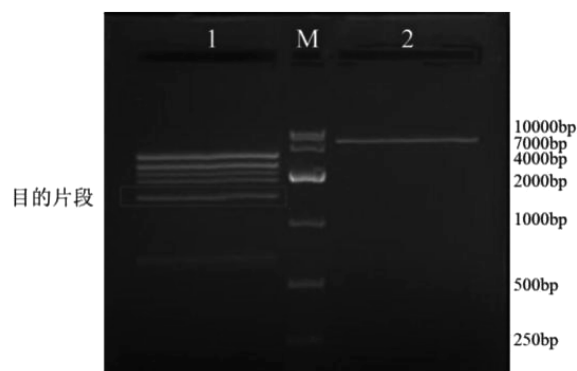
M:DL 2000 DNA Maker;泳道 1—9:

菌落 PCR 扩增结果;泳道 10:阴性对照

图 2 *E. coli* DH5 α -*epnC* 重组菌菌落 PCR 扩增结果
Fig. 2 *E. coli* DH5 α -PCR amplification results of *epnC* recombinant bacterial colonies

M:DL 10000 DNA Maker;泳道 1~6:重组质粒单酶切结果,
epnC 基因片段大小约为 1 958 bp,载体片段大小约为 3 015 bp图 3 质粒 *epnC*-pGEM-T Easy重组质粒 *EcoR* I 单酶切电泳结果

Fig. 3 Single enzyme digestion electrophoresis results of recombinant plasmid *EcoR* I with plasmid *epnC*-pGEM-T Easy



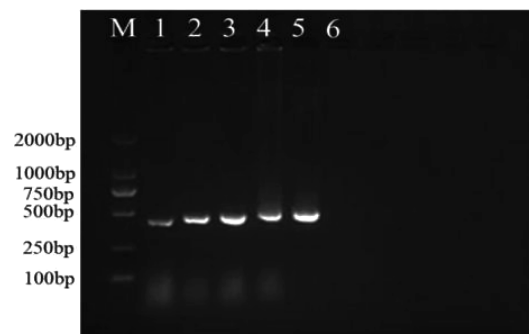
泳道 1:*epnC*-pGEM-T Easy 重组质粒双酶切结果,
目的片段 *epnC* 大小约为 1 958 bp;M:DL 10000 DNA Maker;
泳道 2:pkk223 载体双酶切结果,目的片段大小约为 4 554 bp

图 4 *epnC*-pGEM-T Easy 重组质粒、
pkk223 载体 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切结果

Fig. 4 *EcoR* I and *Hind* III double enzyme digestion results of *epnC*-pGEM-T Easy recombinant plasmid and pkk223 vector

3.2 表达载体的转化

将 pkk223-*epnC* 连接产物通过热击法分别转入 *E. coli* DH5 α 、沙门氏菌 NC28、沙门氏菌 NC141 后,进行蓝白斑筛选,在平板上挑取 5 个白斑单菌落,提取质粒进行 PCR,目的片段大小约为 439 bp,结果如图 5 所示。PCR 结果证实 pkk223-*epnC* 表达载体已经成功转化到重组菌中。



M:DL 2000 DNA Maker;泳道 1~5:

重组菌质粒 PCR 扩增产物;泳道 6:阴性对照

图 5 重组菌质粒的 PCR 扩增结果

Fig. 5 PCR amplification results of recombinant bacterial plasmids

3.3 重组菌多粘菌素 B 耐药性检测

重组菌进行多粘菌素 B 耐药性检测,结果如表 1 所示。按 CLSI 标准,沙门氏菌 NC28、大肠杆菌 DH5 α 为多粘菌素 B 敏感(MIC<2 μ g/mL),沙门氏菌 NC141 为多粘菌素 B 低耐药(MIC $\geq$ 4 μ g/mL)。pkk223-*epnC* 表达载体转化这 3 个菌后,重组菌对多粘菌素 B 的耐药性不变。

表 1 多粘菌素 B 耐药性检测结果

Table 1 Resistance test results of Polymyxin B

项目	DH5 α	NC28	NC141
出发菌	<2 μ g/mL	0.5 μ g/mL	4 μ g/mL
重组菌	<2 μ g/mL	0.5 μ g/mL	4 μ g/mL

3.4 重组菌生物膜测定

对出发菌和重组菌分别进行生物膜检测,结果如图 6 所示,多粘菌素敏感株沙门氏菌 NC28 与其重组菌的生物膜成膜能力无显著性差异。多粘菌素低耐药株沙门氏菌 NC141 与其重组菌的生物膜成膜能力有显著差异($P<0.05$)。

4 结论与讨论

多粘菌素耐药机制大多与 LPS 的修饰有关,L-Ara4N 或 PEtn 对 LPS 进行共价修饰可导致多粘菌素耐药^[10]。EptC 作为一种乙醇胺转移酶可以对

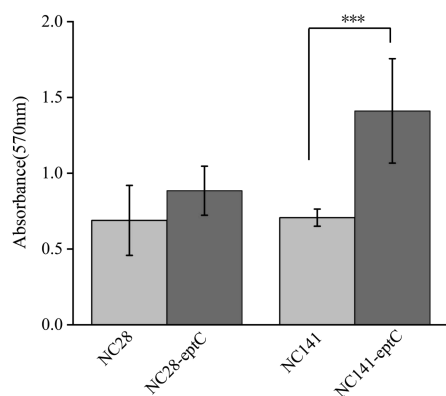


图6 NC28与NC28-*eptC*、NC141与NC141-*eptC*的生物膜成膜能力的差异及显著

Fig. 6 The difference and significance of biofilm formation ability between NC28 and NC28-*eptC*, NC141 and NC141-*eptC*

LPS进行修饰,Thomas W. Cullen等研究发现空肠弯曲菌中*eptC*基因的过表达可导致其对多粘菌素的耐药性增加^[11]。在本文中,将多粘菌素B高耐药菌株A7中的*eptC*基因在沙门氏菌细胞中过表达,重组菌对多粘菌素的耐药性均无变化,说明*eptC*基因在沙门氏菌中的过表达不会增加沙门氏菌对多粘菌素的耐药性。Yanqun Zhao^[12]等研究发现*eptC*基因过表达没有导致*E. coli*对多粘菌素耐药性增加,将*E. coli*中EptC蛋白C段的催化结构域进行了解析,发现其不具有二硫键结构,故其过表达没有导致*E. coli*耐药性的增加。本文中*eptC*基因过表达没有导致沙门氏菌耐药性增加的原因可能与此类似,*eptC*基因SNP突变并不是沙门氏菌对多粘菌素产生耐药性的直接原因。

生物膜的存在会增强细菌对抗生素的耐药性,与细菌感染有着密切的关系,也对食品品质有着极大的负面影响^[13]。目前沙门氏菌生物膜形成机制尚不清晰,生物膜的形成需要细菌细胞之间的相互聚集黏附^[14]。鞭毛在生物膜的形成过程中起着重要的作用,有研究显示鞭毛在肠炎沙门氏菌体外生物膜形成中具有重要作用^[15]。沙门氏菌鞭毛在生物膜的形成初期起着重要的介导黏附作用,并作为运动力的提供者而促进生物膜的形成^[16]。在本文中,重组菌的生物膜成膜能力均有提高,其中低耐药重组菌株的成膜能力变化较为显著,说明*eptC*基因的过表达在一定程度上可以有助于生物膜的形成。EptC可以对鞭毛杆蛋白FlgG进行pEtN修饰^[17],故推测EptC可能通过修饰FlgG蛋白从而影响沙门氏菌的生物膜成膜能力。

多粘菌素耐药机制较为复杂,PhoP/PhoQ和

PmrA/PmrB系统基因突变是多粘菌素耐药的主要原因之一,双组分系统涉及的调控因子非常多,EptC也是其中之一。本文研究结果有助于解析多粘菌素耐药机制,为双组分系统介导多粘菌素耐药的研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] 李立,叶璟,胡蕾,等. 多粘菌素用法及药代动力学研究进展[J]. 药学与临床研究,2021,29(06):454-457+461.
- [2] 蔡长龙,王婷,唐朝,等. 低能氮离子注入诱变大肠杆菌对多粘菌素B的耐药研究[J]. 西安工业大学学报,2022,42(03):217-222.
- [3] 曹林. 大肠埃希菌中多粘菌素耐药基因*mcr-1*的流行病学调查和分子特征研究[D]. 合肥:安徽医科大学,2019.
- [4] Mlynarcik P, Kolar M. Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of *mcr* genes [J]. Biomedical Papers, 2019, 163(1):28-38.
- [5] Meletis G, Skoura L. Polymyxin resistance mechanisms: from intrinsic resistance to *mcr* genes [J]. Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery, 2019, 13(3):198-206.
- [6] Hussein N H, Al-Kadmy I M S, Taha B M, et al. Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review [J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(3):2897-2907.
- [7] Cullen T W, O'Brien J P, Hendrixson D R, et al. EptC of *Campylobacter jejuni* mediates phenotypes involved in host interactions and virulence [J]. Infect Immun, 2013, 81(2):430-440.
- [8] Lamas A, Miranda J M, Regal P, et al. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica* [J]. Microbiology Research, 2018, 206:60-73.
- [9] 陈富珍,陈丽英,王乔花,等. 大理州鸡源沙门氏菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 云南畜牧兽医, 2022(2):17-20.
- [10] 王影,李艳然,韩镌竹,等. 多粘菌素耐药性的研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1):200-206.

(下转第58页)

- 复方对杀鱼爱德华氏菌的体外抑菌效果[J]. 甘肃农业大学学报, 2022, 57(02): 27-35.
- [34] 金顺琪, 张露蓉, 半枝莲药理效应及临床应用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(8): 194-198.
- [35] 王桂玲, 房建强, 边书芹, 等. 半枝莲中总生物碱的提取及抑菌作用的初步研究[J]. 中成药, 2013, 35(06): 1315-1319.
- [36] 王宝屯, 郭晗, 王梦雅, 等. 76 味中草药对无乳链球菌体外抑菌作用[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2021, 42(05): 67-71.
- [37] 李华, 李强, 付雷. 几种中草药对海水养殖中常见病原菌的抗菌作用[J]. 大连海洋大学学报 2011, 26(01): 6-11.
-
- (上接第 45 页)
- [11] Cullen T W, Madsen J A, Ivanov P L, et al. Characterization of unique modification of flagellar rod protein FlgG by *Campylobacter jejuni* lipid A phosphoethanolamine transferase, linking bacterial locomotion and antimicrobial peptide resistance[J]. The Journal of biological chemistry, 2012, 287(5): 3326-3336.
- [12] Zhao Y, Meng Q, Lai Y, et al. Structural and mechanistic insights into polymyxin resistance mediated by EptC originating from *Escherichia coli* [J]. The FEBS journal, 2019, 286(4): 750-764.
- [13] 尹彬茹. 牛肉源沙门氏菌生物膜形成特性及相关基因表达调控初探[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [14] 杨克慧, 董鹏程, 刘昀阁, 等. *pmrA* 影响酸胁迫鼠伤寒沙门氏菌生物膜的形成能力[J]. 中国食品学报, 2023, 23(3): 147-156.
- [15] 朱春红, 董立伟, 张江英, 等. 鞭毛素 *fliC* 基因的缺失对肠炎沙门氏菌生物膜形成的影响[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(4): 303-306.
- [16] Wolska K I, Grudniak A M, Rudnicka Z, et al. Genetic control of bacterial biofilms[J]. Journal of applied genetics, 2015, 57(2): 1-14.
- [17] Cullen T W, Madsen J A, Ivanov P L, et al. Characterization of unique modification of flagellar rod protein FlgG by *Campylobacter jejuni* lipid A phosphoethanolamine transferase, linking bacterial locomotion and antimicrobial peptide resistance[J]. The Journal of biological chemistry, 2012, 287(5): 3326-3336.