

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (11):1279–1288; 4 November 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.005

耻垢分枝杆菌的蚯蚓血红蛋白样蛋白 MSMEG_3312 影响其大环内酯类药物的敏感性

黄鹂歌^{1,2#}, 胡新玲^{2#}, 陶均², 米凯霞^{2,3*}

¹ 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230601

² 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

³ 北京市病原微生物耐药与耐药基因组重点实验室, 北京 100101

摘要: 【目的】活性氧类分子是机体有氧代谢的自然产物, 可以引起氧化损伤, 导致细胞 DNA 突变、蛋白质失活, 是细菌耐药产生的原因之一。蚯蚓血红蛋白家族是能携带氧、可逆地结合氧的一类蛋白, 在氧化过程中发挥重要作用, 与活性氧类分子介导的细菌耐药相关。预测耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) MSMEG_3312 是蚯蚓血红蛋白样蛋白, 其功能可能与细菌抗药性有关。【方法】通过生物信息学预测耻垢分枝杆菌 MSMEG_3312 的结构特征。通过基因敲除、遗传互补和抗药性分析以及启动子表达测定等方法研究 MSMEG_3312 与耻垢分枝杆菌抗药的相关性。【结果】与野生菌株 mc²155 相比, *msmeg_3312* 敲除菌株表现为抗大环内酯类抗生素, 而且回补 *msmeg_3312* 部分丧失了这种耐药表型。此外, 大环内酯类抗生素的胁迫在统计上显著下调 *msmeg_3312* 启动子的表达。另外, 对作用于核糖体的其他药物, 敲除菌株和野生菌株没有抗药性差异。【结论】生物信息学分析显示 MSMEG_3312 的氨基酸序列具有典型的蚯蚓血红蛋白保守的 HHE 结构域, 预测其二级结构含有 4 个 α -螺旋组成的典型蚯蚓血红蛋白结构。MSMEG_3312 与耻垢分枝杆菌对大环内酯类抗生素的药物敏感性相关, 其可能通过影响药物与核糖体 50S 亚基的作用来发挥功能。

关键词: 蚯蚓血红蛋白样蛋白, MSMEG_3312, 活性氧, 耐药性

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 11-1279-10

蚯蚓血红蛋白是一种非血红素载氧蛋白, 广泛分布于细菌、古菌、海洋无脊椎生物及高级动物中。蚯蚓血红蛋白是 3 种主要的金属蛋白之一, 与其他两种金属蛋白血红蛋白和血蓝蛋白结构不同, 蚯蚓血红蛋白包含 1 个由两个铁离子组成的活性中心, 可逆地与氧原子结合^[1]。氧结合、两个铁离子的活

性中心是蚯蚓血红蛋白的特征。氧与其非血红素铁离子中心结合, 这个中心含有的 2 个金属铁原子分别与 1 个谷氨酸、5 个组氨酸以及 1 个天门冬氨酸的保守序列 H-HXXXE-HXXXH-HXXXXD^[2] (HHE 结构域) 相连。蚯蚓血红蛋白通常以多聚体状态存在, 每个亚基由 4 个平行的 α -螺旋折叠而成, 约含

基金项目: 国家自然科学基金 (31270178 和 31070118)

* 通信作者。Tel: +86-40-64806082; E-mail: mik@im.ac.cn

作者简介: #并列第一作者。黄鹂歌 (1989 -), 女, 安徽省宣城市人, 硕士研究生, 主要从事病原细菌学研究, E-mail: huanglige0563@126.com; 胡新玲 (1977 -), 女, 北京市人, 助理研究员, 主要从事病原细菌学研究, E-mail: huxl@im.ac.cn

收稿日期: 2014-03-02; 修回日期: 2014-04-11

有 113 - 117 个氨基酸残基^[3]。

蚯蚓血红蛋白可逆地与氧结合,在氧代谢过程中起到重要作用,目前已知的主要作用有:1、储存氧原子或者将氧传递给需氧的酶(如 *Methylococcus capsulatus* 中的 McHr);2、作为感知氧原子的原件(如 *Desulfovibrio vulgaris* 中的 DcrH);3、结合氧原子参与解毒机制;4、储存铁离子(如 *Theromyzon tessulatum* 的卵蚯蚓血红蛋白);5、结合铁离子或者其他离子参与解毒机制(如 *Neanthes diversicolor* 中的 MPlI 参与钼解毒);6、参与一些与结合氧和离子无关的作用^[4]。

氧气是很多生物体生命活动的基础物质之一,其主要作用是参与能量代谢,生成 ATP 和水。但是氧代谢过程中还可以产生一系列的中间产物,包括氧自由基如超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2)和单线态氧(O_2)等。这些物质具有较强的氧化能力,统称为活性氧^[5-7]。体内活性氧分子的产生是细胞有氧代谢的自然结果,生物体摄入的氧,有 2% 可以转化为活性氧^[8]。它们可以与生物体内的大分子物质发生反应,引发氧化损伤^[9]。活性氧分子可以直接与核酸分子作用,通过多种方式如点突变、碱基羟基化、嘌呤氧化以及蛋白 DNA 交联等导致 DNA 突变,改变核酸结构;或者引起 DNA 的剪切、降解和修饰,影响 DNA 的复制,阻碍蛋白质合成^[10-11];由活性氧分子介导的蛋白修饰能导致一些关键酶活性受到抑制,也能诱导蛋白变性导致蛋白功能丧失^[12]。这些 DNA 和蛋白水平的改变可能与耐药性的形成有关^[13-15]。

分枝杆菌属的蚯蚓血红蛋白的生物功能尚未见报道,特别是关于蚯蚓血红蛋白参与耐药的研究。本研究利用遗传学手段研究结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的模式菌株耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)蚯蚓血红蛋白样蛋白 MSMEG_3312 (hemerythrin HHE cation binding domain-containing protein)的功能,我们的研究显示 *msmeg_3312* 敲除菌株获得大环内酯类药物的抗性,并探讨了其可能的耐药机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基:耻垢分枝杆菌 mc²155

(Accession: NC_008596.1) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , 质粒 p0004s、pHAE159 和 pMV361 由本实验室保存。LB 培养基用于大肠杆菌培养。耻垢分枝杆菌培养所用培养基为 Middlebrook 7H9 (液体)和 7H10 (固体)(Becton Dickinson)。耻垢分枝杆菌培养中添加潮霉素和卡那霉素的浓度分别是 50 和 25 mg/L。大肠杆菌培养中添加潮霉素、卡那霉素和氨苄青霉素的浓度分别是 150、50 和 100 mg/L。

1.1.2 主要试剂和仪器: BCL-4000A/1360A 型超净工作台(北京亚泰克隆仪器技术有限公司), DK-8D 型电热恒温水浴槽(上海一恒科技有限公司), 恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司), MicroCL17R 离心机(Thermo Electron Corporation), PCR 仪(北京东胜创新生物科技有限公司), ECM399 电转仪(BTX), HE-120 多功能水平电泳槽(上海天能科技有限公司), EPS-300 电泳仪(上海天能科技有限公司), 凝胶图像分析系统(DNR Bio-imaging System 公司), HZQ-X160 全温振荡培养箱(江苏太仓市实验设备厂), Millipore 针孔式过滤器(0.22 μm)(Millipore), 一次性使用注射器(上海治宇医疗器械有限公司), Nanodrop ND-100 spectrophotometer (NanoDrop Technologies)。7H9、7H10 培养基(Becton Dickinson), 琼脂糖(Biowest)、牛血清白蛋白、潮霉素(Hygromycin B, Hgy)、红霉素(Erythromycin, EM)(GenView), 土霉素(Oxytetracycline, OT)(MERCK), 阿奇霉素(Azithromycin, AZM)(SIGMA), 庆大霉素(Gentamicin, GM)、四环素(Tetracycline, TET)、氯霉素(Chloramphenicol, CM)、氨苄青霉素(Ampicillin, AMP)、卡那霉素(Kanamycin, KAN)、链霉素(Streptomycin, SM)(AMRESCO), *Van91I*、*AlwNI*、*MfeI*、*PacI*(Fermentas), 异烟肼(Isoniazid, INH)、Tween-80(Sigma), T4 DNA 连接酶、*HindIII*、Q5 DNA 聚合酶(New England Biolabs), 过氧化氢、葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 基因敲除

1.2.1 敲除载体构建^[16]和噬菌体扩增:通过 PCR 扩增 *msmeg_3312* 的左右臂,左臂引物是 MSMEG_3312LF 和 MSMEG_3312LR;右臂引物是 MSMEG_3312RF 和 MSMEG_3312RR(表 1)。限制性内切酶 *Van91I* 酶切扩增产物 MSMEG_3312L(左臂)和

MSMEG_3312R(右臂),回收酶切片段,定向克隆到中间载体 p0004S 上,并转化 DH5 α ,挑选单菌落提质粒测序,进而获得载体 p0004-*msmeg_3312*。*PacI* 分别酶切 p0004-*msmeg_3312* 和 phAE159,回收并连接,经体外包装获得 phasmid phAE159-*msmeg_3312*。将 phAE159-*msmeg_3312* 电击转化耻垢分枝杆菌,30℃培养获得噬菌斑,扩增噬菌体,提高滴度到 10¹⁰/mL。

1.2.2 基因敲除:取培养至对数期 (OD_{600} 为 0.6 - 0.8) 的 mc²155,用 MP Buffer 洗 2 次后用 7H9 培养基重悬,然后与噬菌体混匀,置于 37℃ 共培养 3 h,最后将共培养液均匀涂布在含 150mg/L 潮霉素的 7H10 平板上,37℃ 培养。挑选单菌落,提基因组,PCR 验证基因是否被敲除。

1.2.3 敲除菌株的验证:设计了 3 对引物(表 1),即目的基因内部引物和目的基因左右臂远端引物及载体内部引物,通过 PCR 验证目的基因是否被敲除(图 2)。若目的基因被正确敲除,则内部引物 MSMEG_3312-InL 和 MSMEG_3312-InR 不能扩增出片段。而远端引物和载体内部引物能进一步确认载体确实插入正确部位(MSMEG_3312LLL 和 I-L(R);MSMEG_3312RRR 和 I-R(F))。

1.2.4 互补表达质粒的构建和回补菌的建立:PCR 扩增目的基因,引物(表 1)为: pMV361-3312F 和 pMV361-3312R。*MfeI* 和 *HindIII* 酶切回收扩增产物和载体 pMV361^[17]。连接酶切片段,并转化 DH5 α 。挑选单菌落测序,测序正确的质粒电击转入 *msmeg_3312* 突变株感受态细胞。挑选单菌落提取基因组,PCR 验证正确,得到回补菌株 C - Δ *msmeg_3312*。

1.3 药物胁迫实验

从 -80℃ 冰箱冻存管中复苏种子液,存放于 4℃。按 1:100 接种量接种,培养 OD_{600} 至 0.8 - 1.0,将上述菌液再按 1:100 接种量接种于新鲜的培养基,培养 OD_{600} 至 0.3 左右。取出 2 mL 菌液于 50 mL 离心管中,加入红霉素胁迫处理。取对照组和处理组做梯度稀释,每个梯度取 3 μ L 点平板。37℃ 培养 3d 后拍照。

1.4 药物最小抑制浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 测定

上述种子液,按 1:100 接种量接种,培养 OD_{600}

至 0.15。稀释 100 倍后取 40 μ L 加入 96 孔细胞培养板,加入不同浓度的抗生素:异烟肼 (Isoniazid, INH)、过氧化氢 (Hydrogen peroxide, H₂O₂)、红霉素 (Erythromycin, EM)、氯霉素 (Chloramphenicol, CM)、阿奇霉素 (Azithromycin, AZM)、庆大霉素 (Gentamicin, GM)、四环素 (Tetracycline, TET)、土霉素 (Oxytetracycline, OT)、氨苄青霉素 (Ampicillin, AMP)、链霉素 (Streptomycin, SM) 和卡那霉素 (Kanamycin, KAN) 以及利福平 (Rifampicin, RFP),终体积为 80 μ L。37℃ 共培养 3 d 后观察细菌生长状况,对菌生长有抑制的抗生素浓度定为 MIC。实验结果重复 3 次以上。

1.5 由 *msmeg_3312* 启动子驱动的 LacZ 表达质粒的构建

1.5.1 LacZ 表达载体的构建^[18]:提取 *M. smegmatis* 基因组 DNA。设计引物 P_{*msmeg_3312*}F 和 P_{*msmeg_3312*}R 从基因组 DNA 上扩增 *msmeg_3312* 启动子区片段。片段和 P_{LacZ}(+) (pLACint) 载体双酶切后进行连接。连接产物转化感受态细胞 DH5 α ,筛选阳性克隆,提取质粒并做双酶切鉴定。测序成功后,取构建成功的 P_{*msmeg_3312*}-LacZ 质粒转化 *M. smegmatis* 感受态,37℃ 培养 4 - 5 d,挑选单菌落,提基因组,PCR 验证是否转入成功。

1.5.2 β -半乳糖苷酶活性测定:从 -80℃ 冰箱冻存管中复苏种子液,存放于 4℃。按 1% 接种量接种种子液,培养至 OD_{600} 为 0.8 - 1.0,调初始 OD_{600} 为 0.01,37℃ 震荡培养。长至 OD_{600} 为 0.3、1.0、1.5 时分别取菌,12400 \times g 离心收菌,放置于冰上。加入 0.8 mL Z buffer 重悬菌,将重悬的菌液移入螺口管中,加入 1/3 管体积的玻璃珠,用匀浆机破碎细胞 3 - 4 次 (40 秒/次)。破菌后于 4℃ 12000 \times g 离心 15 min,吸取 200 μ L 上清液加入离心管中,再加入 100 μ L 的 ONPG。置于 37℃ 进行显色反应。阴性对照:200 μ L Z buffer + 100 μ L ONPG。待样品变黄后加入 700 μ L 1M Na₂CO₃ 终止反应,测量 OD_{420} 。数值计算公式:1 Miller Unit = 1000 \times OD_{420} / (1/4 \times T \times V \times OD_{600})。T = 反应时间 (min); V = 反应前离心 PBS 重悬液的体积; OD_{600} = 反应前离心 PBS 重悬液的 OD 值。

1.6 生长曲线测定

从 -80°C 取出冻存菌株,用 7H9 培养基复苏。待菌液 OD_{600} 达到 0.8 - 1.0 时,存于 4°C 冰箱作为实验用新鲜种子液(每个月更换 1 次);按 1% 接

种量接种种子液,培养至 OD_{600} 达到 0.8 - 1.0;将上述菌液分别调 OD_{600} 达到 0.01,约 10 h 后每隔 3 h 取 $500\ \mu\text{L}$ 测 OD_{600} 值,记录实验数据,绘制生长曲线。

表 1. 实验用引物汇总表
Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Purpose
MSMEG_3312LF	TTTTTTTCCATAAATTGGTGTGCGCGCTTACCACATCT	To clone the left arm of <i>msmeg_3312</i>
MSMEG_3312LR	TTTTTTTCCATTCTTGGTTCGACCAAGTCCGGTTGTG	
MSMEG_3312RF	TTTTTTTCCATAGATTGGTGAAGAGTTTCAGCGT	To clone the right arm of <i>msmeg_3312</i>
MSMEG_3312RR	TTTTTTTCCATCTTTTGGAAAGTCCAAGCAGGTCAGCC	
MSMEG_3312-InL	CGTGATTCTGGCATCGTG	To confirm <i>msmeg_3312</i> knocked out
MSMEG_3312-InR	ACTCGTGCAGCCGCTCG	
MSMEG_3312LLL	TTGTCGCGTACATCATCCTG	To confirm <i>msmeg_3312</i> knocked out
I-L (R)	TCGACGACCCTAGAGTCC	
MSMEG_3312RRR	TCGGCATCAGCAGCGGAA	To confirm <i>msmeg_3312</i> knocked out
I-R (F)	GACACACCAACAGCATGGT	
pMV361-3312F	CCCGGGCAATTGGC ATGGCTGGTAGCAGAGGCAA	To clone <i>msmeg_3312</i> fragment
pMV361-3312R	CCCGGGAAGCTTTCAGCTGTTCGGCCGCT	
P _{<i>msmeg_3312</i>} F	AAATTTGGATCCATCGCTTGGCAGGTCGGCAT	To clone the promoter of <i>msmeg_3312</i>
P _{<i>msmeg_3312</i>} R	AAATTTGGTACCAGCCATGACTGCCTCCTTGGT	

2 结果

2.1 结构预测

BLAST 分析发现 MSMEG_3312 与真核、原核蚯蚓血红蛋白具有高度的相似性。将 MSMEG_3312 与这些序列进行多重序列比对分析^[19](图 1-A),发现其具有保守的蚯蚓血红蛋白结构域:H-HxxxE-HxxxH-HxxxxD。利用 swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>)^[20]对 MSMEG_3312 进行二级结构预测发现 MSMEG_3312 中含有 4 个 α -螺旋(图 1-B)。4 个 α -螺旋含有 5 个组氨酸、1 个天冬氨酸和 1 个谷氨酸。这些氨基酸组成了活性中心,结合铁离子。通过结构及相关报道推测其功能可能是通过低价铁离子和高价铁离子之间的转换,达到结合氧和释放氧的作用,施行与氧相关的功能。

2.2 敲除菌的构建

利用分枝杆菌噬菌体特异转导法(Mycobacteriophages specialized transduction)获得候选基因的敲除菌株。随机挑选 4 个克隆培养并提取基因组 DNA,用以 PCR 验证突变体。利用引物 InL/InR 检测 *msmeg_3312* 基因内部片段,如图 2-B 所示,在野生型菌株 mc²155 中可以检测到 PCR 产

物(泳道 3),在 *msmeg_3312* 敲除菌株中没有检测到 PCR 产物(泳道 2)。利用载体上的引物和 *msmeg_3312* 左右臂远端引物获得了 PCR 产物(图 2-C、D),说明潮霉素基因置换了 *msmeg_3312*,基因敲除成功。

2.3 耻垢分枝杆菌 *msmeg_3312* 敲除菌株增加大环内酯类药物的抗性

获得敲除菌株 Δ *msmeg_3312* 后,我们首先检测了 MSMEG_3312 是否对细菌生长有影响,我们测定了在丰富培养基 7H9 条件下的生长。如图 3-A 所示, Δ *msmeg_3312* 和 mc²155 以及 C- Δ *msmeg_3312* 生长没有差别,说明 MSMEG_3312 在丰富培养基 7H9 中不影响细菌的生长。

根据以前的研究及结构预测蚯蚓血红蛋白的功能与氧及铁的代谢调节相关^[4],因此我们首先比较了野生型 mc²155 和 Δ *msmeg_3312* 之间 H₂O₂ 抗性的差别。通过测定野生型和突变菌株的 H₂O₂ 最小抑菌浓度实验发现,*msmeg_3312* 突变并不影响耻垢分枝杆菌 H₂O₂ 的敏感性(表 2)。结果显示,MSMEG_3312 并没有影响细菌对 H₂O₂ 的抗性。

蚯蚓血红蛋白的结构特征使其可以结合氧和释放氧,以此推测其可能会影响细菌对氧的利用及细菌中的氧浓度,因而在调控细菌的呼吸作用和能量

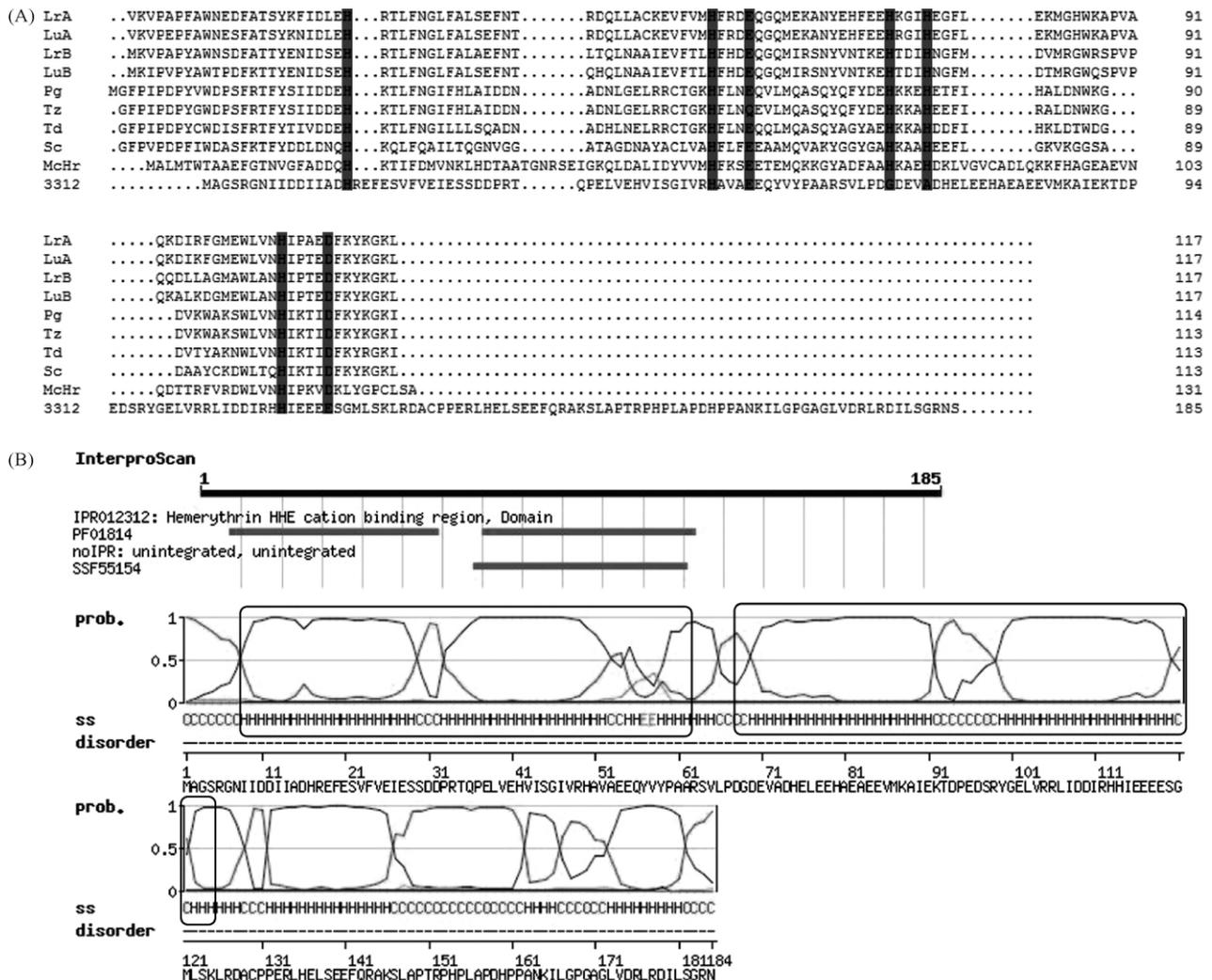


图 1. MSMEG_3312 的结构预测

Figure 1. Structural prediction of MSMEG_3312. A, Alignment of some hemerythrin sequences. Sequence comparison of 8 eukaryotic hemerythrin; Pg, *Pseudomyces gouldii*; Tz, *Themiste zostericola*; Td, *Themiste dyscrita*; Sc, *Siphonosoma cumanense*; LrA, α chain of *Lingula reevii*; LrB, β chain of *Lingula reevii*; LuA, α chain of *Lingula unguis*; LuB, β chain of *Lingula unguis*; and McHr, a bacterial hemerythrin from *Methylococcus capsulatus*. The respective accession numbers are P02244, P02245, P02246, P22766, P23543, P23544, P22764, P22765 and Q60AX2. B, Secondary structural prediction of HHE domain.

代谢中具有作用。而一些药物的摄入依赖于电子传递系统所产生的能量, 这些电子传递系统以氧气为最终受体^[21]。例如, 一些严格厌氧菌因为没有氧气依赖的电子传递系统, 缺少供能途径, 导致不能摄入药物进而导致耐药。因此我们检测了 $\Delta msmeg_{3312}$ 对细菌抗药性的影响。我们比较了敲除菌株 $\Delta msmeg_{3312}$ 及野生菌株 mc^2155 药物敏感性。在表 2 我们列出了所检测的 6 种药物的抗性 (红霉素、异烟肼、链霉素、利福平、氨苄青霉素和卡那霉素), 可以看到, $\Delta msmeg_{3312}$ 对红霉素的 MIC 是野生型菌株的 4 倍, MIC 分别为 12.5 和 3.125 mg/L, 并且

相应的回补菌株部分回复了其耐受性, 表明, MSMEG_3312 确实影响了细菌对红霉素的抗性。

为了进一步确认 $\Delta msmeg_{3312}$ 抗红霉素的表型, 我们检测了野生型、突变株以及回补菌株在红霉素胁迫条件下的生长情况。在 3.125 mg/L 药物胁迫的情况下, $\Delta msmeg_{3312}$ 相对于 mc^2155 有明显的优势, $C-\Delta msmeg_{3312}$ 中这种生长优势能部分消失, 与 $\Delta msmeg_{3312}$ 比较表现为对红霉素敏感 (图 3-B)。为证实耐药结果, 我们还进行了平板耐受实验。结果显示, 在不加入药物的情况下, $\Delta msmeg_{3312}$ 和 mc^2155 没有生长差别, 但是经过药物处理

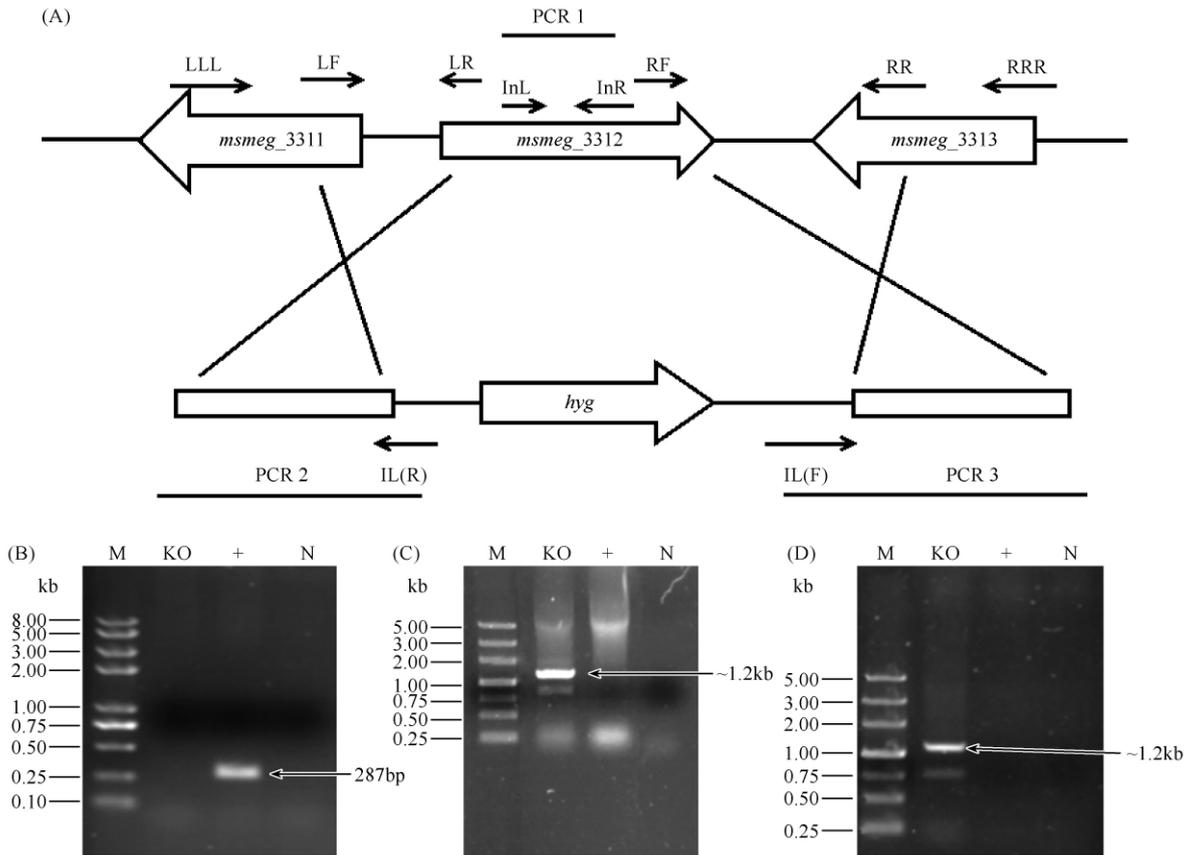


图 2. *msmeG_3312* 敲除菌株的鉴定图谱

Figure 2. Generation of *msmeG_3312* knockout strain. (A) The genomic organization of the *msmeG_3312* gene locus, the upper row shows the locus of target gene in genome, the lower row shows the replacement in vector. (B) The PCR product of the gene fragment in *msmeG_3312* using primer InL/InR (PCR 1); The verification of *msmeG_3312* mutant by PCR using primer LLL/I-L (R) (PCR 2) (C); and RRR/I-R (F) (PCR 3) (D). M represents marker; KO, +, and N represents using $\Delta msmeG_3312$ genomic DNA, *mc*²155 genomic DNA and ddH₂O as PCR template, respectively.

之后,与 *mc*²155 相比, $\Delta msmeG_3312$ 表现出了明显的生长优势(图 3-C)。以上结果表明 MSMEG_3312 确实影响了细菌对红霉素的抗性。

为了进一步探索 *msmeG_3312* 在细菌耐核糖体药物过程中的可能机制,我们检测了突变体和野生型菌株对 4 类作用于核糖体的药物的抗性,即:1、大环内酯类,阿奇霉素、红霉素;2、四环素类,包括四环素和土霉素;3、氨基糖苷类,包括卡那霉素和庆大霉素;4、氯霉素。通过测定 *mc*²155 和 $\Delta msmeG_3312$ 的各个药物的最小抑菌浓度发现, *msmeG_3312* 突变后只对大环内酯类药物的敏感性有明显变化,而对四环素类药物和氨基糖苷类药物的敏感性与 *mc*²155 没有差别,并且 $\Delta msmeG_3312$ 与 *mc*²155 对氯霉素的敏感性没有差别,暗示 *msmeG_3312* 是通过影响药物与 50S 亚基作用而发挥功能的。

表 2. $\Delta msmeG_3312$ 与 *mc*²155 的药敏实验

Table 2. The Minimum inhibitory concentrations (MIC) (mg/L) of Isonicotinic acid hydrazide (INH), Streptomycin (SM), Rifampicin (RFP), Ampicillin (AMP), Kanamycin (KAN), erythromycin (EM), chloramphenicol (CM), azithromycin (AZM), gentamicin (GM), tetracycline (TET), oxytetracycline (OT) and MIC (mmol/L) of in $\Delta msmeG_3312$ strain, *mc*²155 strain and complementary strain C- $\Delta msmeG_3312$ strain, respectively.

Drug strain	<i>mc</i> ² 155	$\Delta msmeG_3312$	C- $\Delta msmeG_3312$
EM	3.125	12.5	6.25
H ₂ O ₂	0.039	0.039	
INH	25	25	
SM	0.32	0.32	
RFP	1.25	1.25	
AMP	100	100	
KAN	1.56	1.56	
AZM	1.56	3.125	
TET	0.098	0.098	
OT	0.195	0.195	
GM	0.78	0.78	
CM	12.5	12.5	

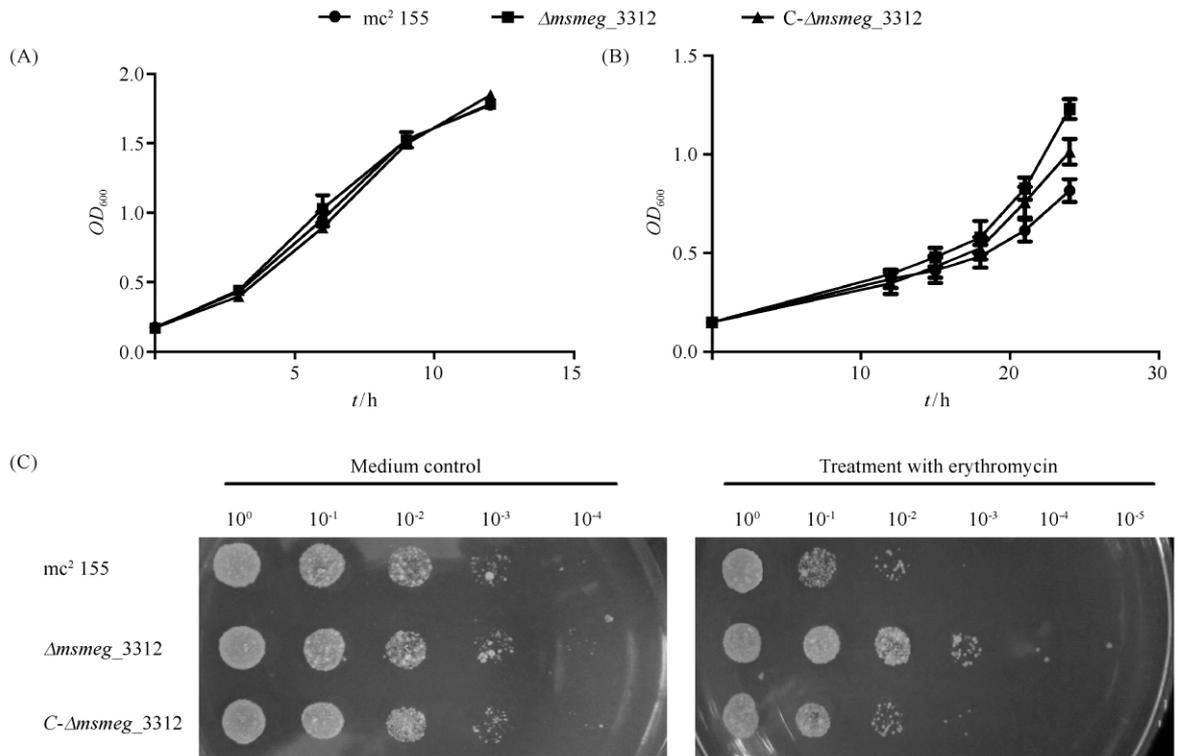


图 3. MSMEG₃₃₁₂ 与红霉素抗性相关

Figure 3. MSMEG₃₃₁₂ is involved in erythromycin resistance. A&B Growth rates of mc²155, Δmsmeg₃₃₁₂ and the complementary strain C-Δmsmeg₃₃₁₂ in 7H9 medium (A) or 7H9 medium with 3.125 mg/L erythromycin (B). C MSMEG₃₃₁₂ plays a negative role in erythromycin resistance. The left panel shows serial dilutions (1:10) of mc²155, Δmsmeg₃₃₁₂ and the complement strain C-Δmsmeg₃₃₁₂ on solid LB medium. As to the right panel, the corresponding strains were spotted on solid LB medium after 1 hour treated with 3.125mg/L erythromycin. Photographs were taken after three days incubation at 37°C. The pictures shown are representative of three independent experiments.

2.4 msmeg₃₃₁₂ 启动子对红霉素的应答反应

为了进一步探索 *msmeg₃₃₁₂* 在耐红霉素中的作用,我们首先 PCR 扩增了 *msmeg₃₃₁₂* 的启动子 (P_{*msmeg₃₃₁₂*}), 并构建了 LacZ 融合表达的载体 P_{*msmeg₃₃₁₂*}-LacZ, 检测 *msmeg₃₃₁₂* 启动子在红霉素胁迫条件下的诱导表达, 分析红霉素是否是在转录水平影响 *msmeg₃₃₁₂*。结果表明, 与未处理的启动子强度比较, 在红霉素处理的情况下, P_{*msmeg₃₃₁₂*} 活性下降, 这说明红霉素影响 *msmeg₃₃₁₂* 转录水平的表达。另外, 双因素方差分析显示药物对 *msmeg₃₃₁₂* 的启动子活性的影响有显著性差异 (图 4)。

3 讨论

通过对结核分枝杆菌的实验模式菌株 *M. smegmatis* 中蚯蚓血红蛋白样蛋白 MSMEG₃₃₁₂ 的

研究, 我们发现 MSMEG₃₃₁₂ 影响 *M. smegmatis* 大环内酯类抗生素的药物敏感性, 并推测其可能通过影响药物与核糖体 50S 亚基作用来发挥功能。

首先, 我们通过生物信息学方法预测得到了 *M. smegmatis* 中 MSMEG₃₃₁₂ 在氨基酸序列上具有蚯蚓血红蛋白典型的 HHE 保守区域和 4 个 α-螺旋的二级结构。推测蚯蚓血红蛋白在机体氧代谢过程中发挥重要作用, 可能与活性氧分子有相关性。我们的实验结果显示 *msmeg₃₃₁₂* 突变没有影响细菌 H₂O₂ 抗性变化 (表 2), 显示其不参与 H₂O₂ 的胁迫途径。这可能是由于 *msmeg₃₃₁₂* 与 *M. smegmatis* 中另外两个蚯蚓血红蛋白样蛋白 MSMEG₂₄₁₅ 和 MSMEG₆₂₁₂ 在功能上有冗余。我们将对 *msmeg₂₄₁₅* 和 *msmeg₆₂₁₂* 功能进行分析。

从 *msmeg₃₃₁₂* 结构推测可能影响细菌氧浓度。为了验证这个假设, 我们挑选了影响蛋白合成

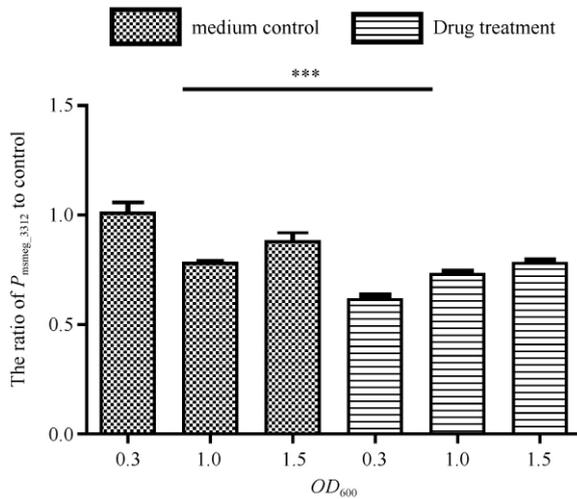


图 4. P_{msmeg_3312} 对红霉素胁迫的应答

Figure 4. When the strain harboring P_{lacZ} or P_{msmeg_3312} were grown to an OD_{600} of 0.3, 1.0 and 1.5, respectively, the strains were treated with 3.125mg/L erythromycin and then the β -galactosidase activities of corresponding strains were measured as indicated. The figure showed the ratio of β -galactosidase activity in the strain carrying P_{lacZ} or P_{msmeg_3312} , respectively. Results are shown as means \pm standard deviations for three replicates. The figure shown is representative of three independent experiments.

途径的相关抗生素,检测突变菌株 $\Delta msmeg_3312$ 的药物敏感性。对常用的几类作用于核糖体的抗生素(大环内酯、四环素、氨基糖苷以及氯霉素类)敏感性检测发现,MSMEG_3312 只影响大环内酯类抗生素的耐受性,对其它几类都没有影响。红霉素的靶点是细菌的核糖体,通过与细菌的 50S 核糖体亚基可逆性结合,抑制新合成的氨基酰-tRNA 分子从核糖体受体部位(A 位)移至肽酰基结合部位(P 位),从而抑制细菌蛋白质合成^[22]。四环素类药物与 30S 亚基有高亲和力结合位点,与核糖体结合后使其变构,从而抑制氨基酰-tRNA 与 A 位点结合使蛋白质合成停止^[23]。氨基糖苷类药物与 30S 亚基上的靶蛋白结合,使 mRNA 上的密码错译,导致异常、无功能的蛋白质合成;阻碍终止因子(R)与核蛋白体 A 位结合,使已合成的肽链不能释放并组织 70S 核蛋白体的解离,最终造成菌体内核蛋白的耗竭^[24]。氯霉素可以可逆地与 50S 亚基结合,阻断转肽酶的作用,干扰带有氨基酸的氨基酰-tRNA 与 50S 亚基结合,组织肽链延伸和细菌蛋白质合成,抑制蛋白质合成^[25]。这些结果反映 MSMEG_3312 特异性参与大环内酯类药物的抗性,而与四环素类和氨基糖苷类

作用于 30S 亚基的药物无关。

细菌对大环内酯类抗生素的耐药主要是由如下原因造成的:抗生素摄入胞内量减少及药物外排活性增强;甲基酶形成物改变了核糖体靶位;细菌酯酶使大环内酯类抗生素水解。 $MSMEG_3312$ 影响分枝杆菌对大环内酯类药物的敏感性,采用的是哪一种方式或者是一种全新的机制,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Stenkamp RE. Dioxygen and hemerythrin. *Chemical Reviews*, 1994, 94 (3) : 715-726.
- [2] Karlsen OA, Ramsevik L, Bruseth LJ, Larsen O, Brenner A, Berven FS, Jensen HB, Lillehaug JR. Characterization of a prokaryotic haemerythrin from the methanotrophic bacterium *Methylococcus capsulatus* (Bath). *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 2005, 272 (10) : 2428-2440.
- [3] Kao WC, Chen YR, Yi EC, Lee H, Tian Q, Wu KM, Tsai SF, Yu SS, Chen YJ, Abersold R, Chan SI. Quantitative proteomic analysis of metabolic regulation by copper ions in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (49) : 51554-51560.
- [4] French CE, Bell JM, Ward FB. Diversity and distribution of hemerythrin-like proteins in prokaryotes. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 2008, 279 (2) : 131-145.
- [5] Datta K, Sinha S, Chattopadhyay P. Reactive oxygen species in health and disease. *The National Medical Journal of India*, 2000, 13 (6) : 304-310.
- [6] Gabbita SP, Robinson KA, Stewart CA, Floyd RA, Hensley K. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 376 (1) : 1-13.
- [7] Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*, 2001, 29 (2) : 345-350.
- [8] Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*, 2003, 10 (23) : 2495-2505.
- [9] Asada K. *Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues*. 1994.
- [10] Brawn K, Fridovich I. DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. *Archives of*

- Biochemistry and Biophysics*, 1981, 206 (2) : 414 - 419.
- [11] Hassan HM, Fridovich I. Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1978, 253 (22) : 8143 - 8148.
- [12] Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 2003, 25 (3-4) : 207-218.
- [13] Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular Cell*, 2010, 37 (3) : 311-320.
- [14] Maiti AK. Reactive oxygen species reduction is a key underlying mechanism of drug resistance in cancer chemotherapy. *Chemotherapy*, 2012, 1 (2) : 104-108.
- [15] Tien Kuo M, Savaraj N. Roles of reactive oxygen species in hepatocarcinogenesis and drug resistance gene expression in liver cancers. *Molecular Carcinogenesis*, 2006, 45 (9) : 701-709.
- [16] Bardarov S, Bardarov Jr S Jr, Pavelka Jr MS Jr, Sambandamurthy V, Larsen M, Tufariello J, Chan J, Hatfull G, Jacobs Jr WR Jr. Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology*, 2002, 148 (10) : 3007-3017.
- [17] Stover CK, De la cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SB, Barletta RG, Jacobs WR, Bloom BR. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*, 1991, 351 (6326) : 456-460.
- [18] Purkayastha A, McCue LA, McDonough KA. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* putative classical nitroreductase gene whose expression is coregulated with that of the *acr* gene within macrophages, in standing versus shaking cultures, and under low oxygen conditions. *Infection and Immunity*, 2002, 70 (3) : 1518-1529.
- [19] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22 (22) : 4673-4680.
- [20] Zdobnov EM, Apweiler R. InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*, 2001, 17 (9) : 847-848.
- [21] Bryan LE, Kowand SK, Van Den Elzen HM. Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1979, 15 (1) : 7-13.
- [22] Chen L. Macrolides and progress in its clinical application. *Chinese Journal of Modern Drug Application*, 2011, 5 (9) : 76-77. (in Chinese)
陈柳欢. 大环内酯类抗生素及其临床应用进展. 中国现代药物应用, 2011, 5 (9) : 76-77.
- [23] Zhang T, Gao X, Gu J. New antibiotics based on ribosomal structure and function. *Chinese Journal of New Drugs*, 2011, 20 (23) : 2330-2334. (in Chinese)
张天娇, 高向东, 顾觉奋. 基于核糖体结构和功能的新型抗生素研究进展. 中国新药杂志, 2011, 20 (23) : 2330-2334.
- [24] Zhang J, Zhang D, Yin X, Zhao M, Wang Y. Advances in the molecular function of aminoglycoside antibiotics and the modifying enzyme inhibitor. *Veterinary Pharmaceuticals and Feed Additives*, 2008, 13 (1) : 11-13. (in Chinese)
张晶, 张德强, 尹秀玲, 赵梅, 王艳丽. 氨基糖苷类药物分子作用机制及钝化酶抑制剂的研究进展. 兽药与饲料添加剂, 2008, 13 (1) : 11-13.
- [25] Wu Q, Jin Y, Zheng H, Liu X. The research progress of chloramphenicol and tetracycline inhibit bacterial protein secretion. *China Biotechnology*, 2010, 30 (7) : 97-100. (in Chinese)
吴琼, 靳野, 郑海学, 刘湘涛. 氯霉素和四环素阻碍细菌蛋白分泌研究进展. 中国生物工程杂志, 2010, 30 (7) : 97-100.

A hemerythrin-like protein MSMEG_3312 influences erythromycin resistance in mycobacteria

Lige Huang^{1,2#}, Xinling Hu^{2#}, Jun Tao², Kaixia Mi^{2,3*}

¹ School of Life Science, Anhui University, Hefei 230601, Anhui Province, China

² CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

³ Beijing Key Laboratory of Microbial Drug Resistance and Resistome, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] Reactive oxygen species are natural products of metabolism in aerobic organisms, which lead to oxidative damage, such as DNA mutation, protein inactivation and drug resistance. MSMEG_3312 was predicted as a hemerythrin-like protein, which can carry oxygen and reversibly bind to oxygen, thus it might play important roles in the process of oxygen metabolism. In this study, we explored the role of MSMEG_3312 in drug resistance. [Methods] On the basis of bioinformatics, we identified the conserved sequence of HHE domain in MSMEG_3312 and it was predicted to have typical α -helix at secondary structure. To explore potential functions of MSMEG_3312, we constructed the *msmeg_3312* knockout strain and compare the susceptibility to various drugs to its parent strain, mc²155. In addition, we also measured the promoter response when treatment of erythromycin. [Results] Genetic results showed that MSMEG_3312 is not necessary for *M. smegmatis* growth at 7H9 rich medium. The *msmeg_3312* knockout strain showed increased erythromycin resistance. Moreover, the drug resistance is only limited to erythromycin which its mechanism of action is by binding to the 50S subunit of the bacteria ribosomal complex and then inhibit protein synthesis. However, there were no different MICs of other antibiotics, targets for protein synthesis inhibition, but not 50S subunit, such as tetracyclines, aminoglycosides and chloramphenicol. Moreover, we also showed that the promoter of *msmeg_3312* responses to erythromycin. [Conclusions] Hemerythrin-like protein MSMEG_3312 is involved in erythromycin resistance.

Keywords: hemerythrin-like protein, MSMEG_3312, reactive oxygen species, drug resistance

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270178, 31070118)

* Corresponding author. Tel: +86-40-64806082; E-mail: mik@im.ac.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 2 March 2014 / Revised: 11 April 2014