

# 吉戈非肠杆菌中 SHV-2 耐药基因的序列分析\*

程玉林 陈民钧

(中国医学科学院北京协和医院 北京 100730)

近来一个值得注意的现象,即肠杆菌科中某些菌属对头孢噻甲羧肟(ceftazidime, caz)等三代头孢菌素的耐药有不同程度增长,这是由于细菌产生了超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESbla),或染色体 I 型酶所致<sup>[1-2]</sup>。在我们前一步的研究中,发现一耐 caz 的 *Ent. gergoviae* 菌株,含有一约 60kb 的可接合转移质粒 pC3773,其上有一编码 SHV 类 ESbla 的基因,为深入了解此 ESbla 基因的分子特点,以及酶结构与功能的关系,本文用测定核苷酸序列的方法进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

与本实验有关的菌株及质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

菌株	质粒	有关耐药标志	来源
<i>E. coli</i> C3773	pC3773	crx, cfp, ctr, ctx, caz, tmp-smz, kan, str, gen,	本工作
<i>E. coli</i> HB101	pMON38	amp(SHV-1), cm	G. A. Jacoby
<i>E. coli</i> HB101	pCHEN1	crx, cfp, ctr, ctx, caz, tmp-smz, kan, str, gen, tet	本工作
<i>E. coli</i> ATCC 25922			美国国家菌种库

缩写: crx, 头孢呋肟; cfp, 头孢哌酮; ctr, 头孢三嗪; ctx, 头孢氯噻肟; caz, 头孢噻甲羧肟; fox, 头霉素甲氧噻吩; tmp-smz, 甲氧苄氨嘧啶-磺胺异唑; kan, 卡那霉素; str, 链霉素; gen, 庆大霉素; rif, 利福平; nal, 奈啶酸; amp, 氨苄青霉素; cm 氯霉素; tet, 四环素。

### 1.2 试剂

DNA 限制性内切酶由中国医学科学院基础医学研究所强伯勤教授赠送。溶菌酶购自中国科学院生物物理研究所生化厂, dNTP、X-gal、IPTG、DNA 酶 I、RNase A、DNA 聚合酶 I、T7DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、M13mp19RF DNA 载体购自华美生物技术公司; [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP 购自福瑞公司。

\* 本文系国家自然科学基金资助项目。  
本文于 1992 年 11 月 6 日收到。

### 1.3 质粒 DNA 的提取

质粒微量提取法见文献[3]。大量提取法见文献[4]，用 CsCl-溴化乙锭不连续梯度平衡离心法纯化质粒 DNA。

### 1.4 Southern 杂交

探针片段的酶切、回收参见文献[4]。采用缺口翻译法，以 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  标记探针，在严格的条件下杂交[5]。

### 1.5 克隆与测序

基因的克隆，以及次克隆到 M13mp19 载体上的方法见文献[4]。核苷酸序列测定采用 Sanger 双脱氧聚合酶链终止法[6]。

## 2 结果

将耐药质粒 pC3773 上的 ESbla 基因克隆到 pBR322 的 EcoR I 位点上，得到一重组质粒 pCHEN1，酶切分析表明此重组质粒含约 6.5kb 大小的插入片段(图 1)。

从文献中我们了解到，SHV 类的 ESbla 基因的突变位点位于 SHV-1(重组质粒 pMON38 上)中，0.36kb Pvu II -Pvu II 和 0.45kb Pvu II -Cla I 两个片段上[2,7]。

用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  标记上述两个片段做为探针，采用 Southern 杂交法，发现在重组质粒 pCHEN1 上存在着相应的同源片段，即约 0.3kb Pvu II -Pvu II 和 0.5kb Pvu II -Cla I 两个片段(见图 2 和图 3)。

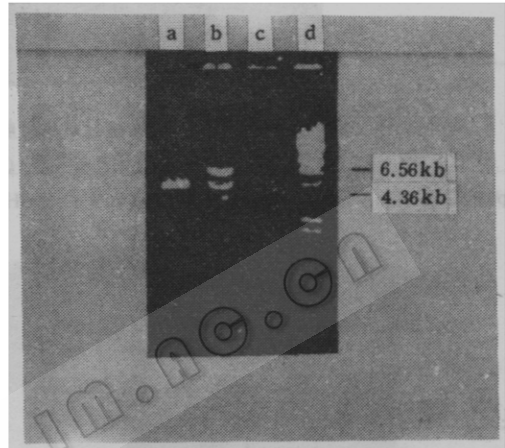


图 1 重组质粒 pCHEN1 的酶切分析  
a 和 c. 载体 pBR322+EcoRI; b. 重组质粒 pCHEN1+EcoRI; d.  $\lambda$ DNA+Hind III.

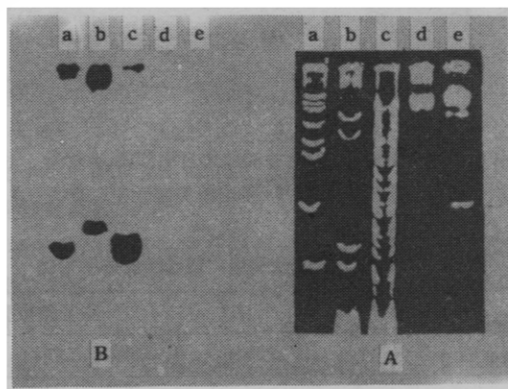


图 2 用 0.36kb SHV-1 探针重组质粒 pCHEN1 做 Southern 杂交分析

(A)凝胶溴化乙锭染色;(B)凝胶放射自显影图。

a. pCHEN1+Pvu II ; b. pMON38+Pvu II ; c. pC3773+Pvu II ; d. pBR322+EcoRI ; e.  $\lambda$ DNA+Hind III.

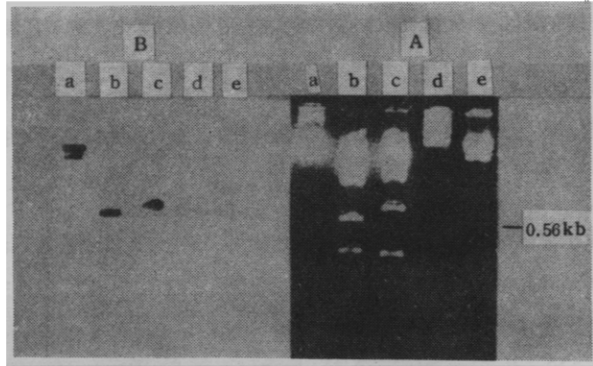


图3 用 0.45kb SHV-1 探针针对重组质粒 pCHEN1 做 Southern 杂交分析  
(A)凝胶溴化乙锭染色;(B)凝胶放射自显影图。

a. pCHEN1+Cla I ; b. pCHEN1+Cla I +Pvu I ; c. pCHEN1+Pvu I ; d. pBR322+EcoR I ; e. λDNA+Hind III.

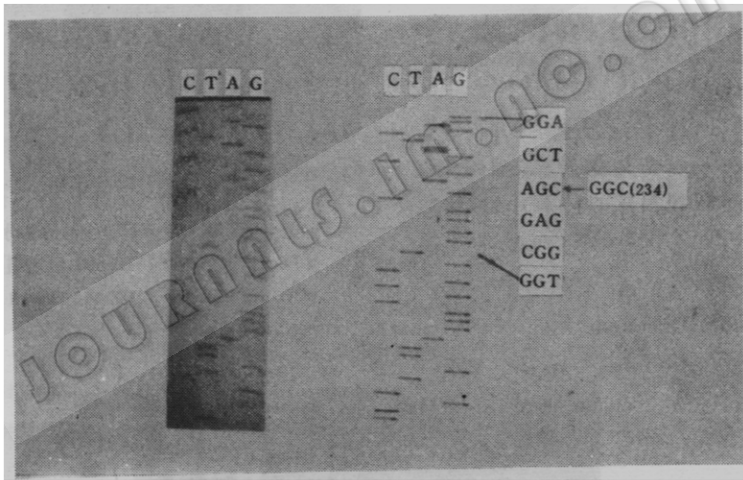


图4 序列分析的放射自显影图  
显示 pC3773 上 ESbla 基因的关键性突变点。

表2 SHV 类 β-内酰胺酶超广谱活性的分子基础

β-内酰胺酶	氨基酸位置		
	201	234	235
SHV-1	Arg	Gly	Glu
SHV-2	Arg	Ser	Glu
SHV-3	Leu	Ser	Glu
SHV-4	Leu	Ser	Lys
SHV-5	Arg	Ser	Lys

将 0.3kb 片段连到 M13mp19 载体的 Sma I 位点上, 0.5kb 片段连到 M13mp19 载体的 Sma I 和 Acc I 位点上, 然后提取单链模板进行测序。

SHV 类酶一共有 286 个氨基酸, 其中有 21 个氨基酸位于前导肽, 不出现在成熟的酶中。根据 201、234 和 235 位氨基酸的不同, 将 SHV 类  $\beta$ -内酰胺酶分为 5 型(表 2)<sup>[2,8]</sup>。上述的两个测序片段包含了第 86 位氨基酸后所有氨基酸的密码子。测序结果显示, 耐药质粒 pC3773 上的 SHV 类 ESbla 基因的第 203 和 235 位的密码子与 SHV-1 的完全相同; 而第 234 位的密码子为 AGC(编码 Ser), SHV-1 的则为 GGC(编码 Gly), 即发生了 G→A 的点突变(见图 4)。此点突变是 SHV 类的 ESbla 与广谱的 SHV-1 的根本区别之一。根据表 3, 出现于我院的此 ESbla 为 SHV-2。

表 3 SHV-1 和来源不同的 SHV-2 间的分子差异

菌株及酶(国家)	位置									
	31		134		183		234		262	
	co*	aa#	co	aa	co	aa	co	aa	co	aa
SHV-1	CTA	Leu	CTA	Leu	GCC	Ala	GGC	Gly	ACC	Thr
SHV-2:										
<i>K. pneumoniae</i> 5214773 (美国)					GCG	Ala	AGC	Ser		
<i>K. ozaenae</i> 2180 (德国)							AGC	Ser		
<i>S. typhimurium</i> 122 (法国)	CAA	Gln					AGC	Ser		
<i>Ent. gergoviae</i> 3777 (中国)			CTG	Leu			AGC	Ser	ACG	Thr

\*: 密码子; #: 氨基酸

### 3 讨论

编码 ESbla 的基因在质粒上, 它们是由早已存的质粒介导的酶基因 SHV-1, TEM-1 或 TEM-2 经点突变而来。1983 年在德国一克雷伯氏菌株中发现了第一个 ESbla 即 SHV-2<sup>[9]</sup>。现在已在临床分离菌中检测到了四种不同的 SHV 类的 ESbla。

序列分析结果证实, *Ent. gergoviae* 3773 产生的 ESbla 为 SHV-2。在世界上的许多地方都报道了 SHV-2 的存在。与 SHV-1 相比, 所有的 SHV-2 在第 234 位都变为 Ser。除此根本变化外, 来源不同的 SHV-2 还有一些各具特色的无表型突变(表 3)<sup>[8,10,11]</sup>, 它们或者密码子有变化, 但编码的氨基酸不变; 或者两者都有变化, 但这些变化不影响酶功能。出现于我院的 SHV-2 至少在第 134 位和第 262 位这两个位置上密码子有变化, 但编码的氨基酸不变。

在一级结构上第 234 位氨基酸与酶活性中心起催化作用的 Ser<sub>66</sub> 相隔甚远, 但在三维空间结构上二者甚为接近, 第 234 位氨基酸位于酶活性中心的底物结合部位, 推测当由 SHV-1 的 Gly 变 ESbla 的 Ser 后, 后者羟基氢原子可与三代头孢菌素以氢键结合<sup>[12]</sup>, 使得 ESbla 能结合和分解三代头孢菌素。今后, 有必要开展定向突变和计算机模拟的研究, 以便更深入地了解酶分子结构与功能间的关系。

### 参考文献

- [1] Payne d J, Amyes S G B. *J Antimicrob Chemother*, 1991, 27: 255-261.
- [2] Jacoby G A, Medeiros A A. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35: 1697-1704.
- [3] Takahashi S, Nagano Y. *J Clin Microbio*, 1984, 20: 608-613.
- [4] Sambrook J, Fritch E F, Maniatis T. Extraction and Purification of Plasmid DNA. In: *Molecular Cloning*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1. 25-1. 52.

- [5] Huovinen S, Huovinen P, Jacoby G A. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988, **32**:175-179.
- [6] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **79**:5463-5467.
- [7] Mercier J, Levesque R C. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, **34**:1577-1583.
- [8] Huletsky A, Couture F, Levesque R C. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, **34**:1725-1732.
- [9] Kliebe C, Nies B A, Meyer J F *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, 1985, **28**:302-307.
- [10] Billot-Klein D, Gutmann L, Collatz E. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, **34**:2439-2441.
- [11] Garberg-Chenon A, Godard V, Labia R *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, **34**:1444-1446.
- [12] Herzberg O, Mout R. *Science*, 1987, **236**:694-701.

## NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF SHV-2 $\beta$ -LACTAMASE GENE IN *ENTEROBACTER GERGOVIAE*

Cheng Yulin Chen Minjun\*

(Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730)

**Abstract** The extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESbla) gene on R-plasmid harbored in *E. coli* C3773, a transconjugant of the clinical isolate of *Ent. gergoviae* 3773 from our hospital, was cloned and two fragments were subcloned into M13. The nucleotide sequences of two fragments were determined. The primary structure of this ESbla deduced from nucleotide sequence had only a Gly  $\rightarrow$  Ser change at position 234 in comparison with SHV-1, which was supposed to be responsible for extended-spectrum activity and resistance to 3rd generation cephalosporins. The result suggested that the ESbla appearing in our hospital was SHV-2.

**Key words** *Enterobacter gergoviae*, SHV-2, Nucleotide sequencing

\* Corresponding author