

陈琳,管远红,黄东璋,等. 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 耐药重组菌的构建及其稳定性研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):167-170.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.044

# 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 耐药重组菌的构建及其稳定性研究

陈琳,管远红,黄东璋,齐富刚,魏冬霞,陈瀛川,张欢,王亚南,苏哲君,  
张洪涛,区卓麟,陈冬冬,吴怀秀,于淼淼,杨雨秋  
(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 22530)

**摘要:**为构建 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 重组菌并测定其稳定性,应用分子克隆技术构建 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 重组菌,采用菌落 PCR、双酶切、药敏试验及序列分析等方法鉴定重组质粒,测定重组菌的生长曲线及传代后的最低抑菌浓度(MICs)以确定重组菌的稳定性。结果表明,构建了 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 重组菌 pRmtB1、pRmtB2、pRmtB4。重组菌对阿米卡星、庆大霉素高度耐药。在没有抗生素选择压力下传代 3 次后,3 株重组菌的生长曲线基本相似,但只有 pRmtB1 维持了对庆大霉素和阿米卡星的高度耐药性。由此可知,重组菌 pRmtB1 较稳定,可作为 16S rRNA 甲基化酶耐药抑制剂筛选模型。

**关键词:**16S rRNA 甲基化酶;RmtB;重组;分子克隆;耐药性

**中图分类号:**S859.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)19-0167-03

抗耐药菌感染已成为世界性难题,研究细菌耐药机制,针对耐药机制寻求新的抗感染药物,寻找一些增强或保护现有抗菌药物抗菌活性的物质,已成为抗感染治疗尤其是抗耐药菌感染治疗的一个重要研究方向。

16S rRNA 甲基转移酶是近年来出现的一种介导临床菌对氨基糖苷类抗生素尤其是对 4,5-及 4,6-二脱氧链霉素类氨基糖苷类抗生素高度耐药的核糖体 RNA 甲基转移酶<sup>[1]</sup>。编码 16S rRNA 甲基转移酶的基因大多位于质粒、转座子、整合子、插入序列共同区等可动遗传因子上,具有易于传播和扩散的特点<sup>[2-5]</sup>。目前,几乎世界各地均有 16S rRNA 甲基转移酶耐药临床菌出现的报道,且有不断增多的趋势<sup>[6-8]</sup>,这给临床抗革兰氏阴性菌感染治疗带来巨大的挑战。因此,通过系统研究 16S rRNA 甲基转移酶耐药机制,建立有效的药物筛选模型,寻找有效的药物来抑制 16S rRNA 甲基转移酶的活性或进一步恢复耐药菌对氨基糖苷类抗菌药物的敏感性或降低细菌对氨基糖苷类的耐药性具有重要的理论及临床意义。基于此,本研究进行了 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 耐药重组菌的构建及其稳定性研究,以期对抗耐药菌药物筛选奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株

16S rRNA 甲基化酶阳性菌 *Escherichia coli* (编号 P-25),自临床腹泻猪分离,经 PCR 检测鉴定携带 16S rRNA 甲基化

酶 RmtB。工程菌 *E. coli* JM109,购自 TaKaRa 生物试剂公司。质控菌 *E. coli* ATCC 25922,购自杭州滨和微生物试剂有限公司。

### 1.2 培养基

水解酪蛋白肉汤(MH Broth)、LB 肉汤及 LB 琼脂等,均购自杭州滨和微生物试剂有限公司。

### 1.3 主要试剂

EmeraldAmp Max PCR Master Mix、限制性内切酶 *EcoR* I (8~20 U/ $\mu$ L)及 *Sal* I (8~20 U/ $\mu$ L),DNA 分子量标准 DL 2 000 (50 ng/ $\mu$ L)、250 bp DNA ladder、克隆载体 pMD18-T Vector、TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0, TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0, TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 4.0 等,均购自宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.4 供试药物

共 10 种药物,阿米卡星(效价 630  $\mu$ g/mg)、硫酸庆大霉素(效价 592  $\mu$ g/mg)、新霉素(效价 652 U/mg)、大观霉素(效价 650 U/mg),均购自某质检标准物质中心。氯霉素(99.3%)、氨苄西林(95%)、头孢唑林(99.3%),均购自杭州某微生物试剂有限公司。氟苯尼考(98.63%),购自浙江某药业有限公司。恩诺沙星(98.7%),购自上虞某药业有限公司。多西环素(84.56%),购自河北某制药有限公司。

### 1.5 方法

1.5.1 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 全基因的 PCR 扩增 应用 TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 提取 DNA。设计 RmtB 全序列引物 RmtB-F: 5'-CTGT-CAGACCAAGTTTACTC-3'; RmtB-R: 5'-GGCGCTGT-AAGTATAATGGC-3',均由上海英俊生物技术有限公司合成。确定 PCR 反应体系<sup>[9]</sup>,利用梯度 PCR 确定最佳循环条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,54℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,30 个循环;72℃ 再延伸 5 min。取适量 PCR

收稿日期:2017-04-29

基金项目:中国博士后科学基金面上项目(编号:2013M541740);江苏省泰州市科技支撑项目(编号:TN201519);江苏农牧科技职业学院重点项目(编号:NSF201503、NSF201603)。

作者简介:陈琳(1970—),女,四川大竹人,博士,副教授,主要从事抗菌药物耐药机制及兽药安全性评价工作。E-mail:chenlin2008666@126.com。

扩增产物,以 DL 2 000 的 DNA 分子量标准做参考,以 6 V/cm 的电压,用 1.5% ~ 2.0% 琼脂糖凝胶进行电泳,结束后拍照分析电泳结果。

1.5.2 RmtB 的克隆、转化及鉴定 按照 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 DNA 片段纯化回收试剂盒使用说明操作,回收带全长基因的 PCR 产物。将回收的目的 DNA 片断与 pMD18 - T 载体连接,在 16 ℃ 条件下反应 1 h,同时按分子克隆试验指南操作<sup>[10]</sup>制备感受态细胞并确定 RmtB 重组质粒转化体系,然后进行连接转化,挑取白色菌落,使用菌落或菌液 PCR 法确认载体中插入片段的长度大小。用 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 4.0 提取重组质粒,进行电泳和含量测定。依照 RmtB 重组质粒双酶切鉴定体系(表 1),用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切重组质粒 DNA,37 ℃ 恒温水浴 4 h 后,取 5 ~ 10 μL 酶切产物,1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察重组菌提取结果。同时将菌落 PCR 及双酶切鉴定阳性菌落送至华大基因进行序列测定,测序结果采用 DNA Star 6.0 与 GenBank 上下载的序列进行 MegAlign。

1.5.3 RmtB 重组菌的药物敏感性检测 选取受试药物,按

表 1 RmtB 重组质粒双酶切鉴定体系

反应液组分	体积(μL)
质粒(140 μg/mL)	5.0
10 × M buffer	2.0
<i>EcoR</i> I	1.0
<i>Sal</i> I	1.0
灭菌双蒸水	11.0
总体积	20.0

照 CLSI 的指导原则选取溶剂进行配制和稀释,在 MH 琼脂平板上挑取单个菌落接种于 2 mL Muller - Hinton(MH)肉汤管中,37 ℃ 振荡培养 4 ~ 8 h,用调节过 Ca、Mg 离子的 MH 肉汤稀释菌液,使稀释菌液达到 0.5 麦氏比浊管浊度,再按 1 : 100 稀释菌液至含菌量约为 1 × 10<sup>6</sup> CFU/mL。然后进行 MICs 测定,记录药敏试验结果,以 MIC 值位于美国临床实验室标准化协会(the Clinical and Laboratory Standards Institute, 简称 CLSI)规定的敏感(susceptible, S)、中介(intermediate, I)、耐药(resistance, R)折点值范围判断药敏试验结果。CLSI 规定的 10 种药物敏感、中介、耐药折点值判断标准见表 2。

表 2 药敏试验判断标准

药物	英文名	MIC 值(μg/mL)			MIC 质控参数 ATCC 25922
		敏感(S)	中介(I)	耐药(R)	
阿米卡星	Amikacin	≤16	32	≥64	0.50 ~ 4.00
庆大霉素	Gentamycin	≤4	—	≥8	0.25 ~ 1.00
氟苯尼考	Florfenicol	≤8	16	≥32	—
恩诺沙星	Enrofloxacin	≤0.25	0.5 ~ 1	≥2	—
氨苄西林	Ampicillin	≤8	16	≥32	2.00 ~ 8.00
多西环素	Tetracycline	≤4	8	≥16	0.50 ~ 2.00
头孢唑啉	Cefazolin	≤8	16	≥32	1.00 ~ 4.00
氯霉素	Chloramphenicol	≤8	16	≥32	2.00 ~ 8.00
硫酸新霉素	Neomycin	≤4	8	≥16 *	—
硫酸大观霉素	Spectinomycin	≤32	—	≥128	—

1.5.4 RmtB 重组菌的稳定性研究 取 RmtB 重组大肠杆菌接种于不含阿米卡星、庆大霉素及氨苄西林的 LB 固体培养基上,37 ℃ 过夜培养。2 d 再挑取平板上的菌落接种于 LB 固体培养基,重复以上操作,连续传 3 代。将上述连续传了 3 代的重组菌接种于 LB 液体培养基,于 37 ℃、200 r/min 振荡培养至菌液 *D*<sub>600 nm</sub> 值约为 0.6。再按照 1 : 100 比例接种于 LB 肉汤的试管中,37 ℃、200 r/min 振荡培养,分别于 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、26、28、30、32 h 后测定菌液的 *D*<sub>600 nm</sub>。以时间为横坐标,菌液 *D*<sub>600 nm</sub> 值为纵坐标,绘出重组菌的生长曲线,测定重组质粒传代以后的最低抑菌浓度(MICs)。

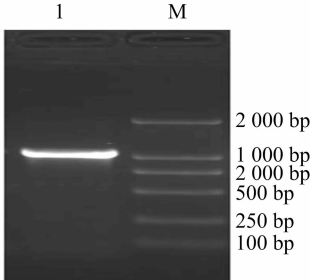
2 结果

2.1 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 编码基因的 PCR 扩增结果

以 16S rRNA 甲基化酶阳性菌 *E. coli*(编号 P - 25)提取的 DNA 为模板,用含 RmtB 全基因的引物进行 PCR 扩增,得到目的片段 RmtB<sub>P-25</sub>(图 1)。

2.2 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 编码基因的克隆转化及结果

回收 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 全基因 PCR 扩增产物,将回收片段与 pMD18 - T 载体连接,并按照分子克隆实验指南转化入大肠杆菌 JM109,挑取 4 个白色菌落,分别命名为 pRmtB1、pRmtB2、pRmtB3、pRmtB4。提取 4 个重组质粒 DNA 进行电泳,结果见图 2。



1—RmtB<sub>P-25</sub>; M—2 000 bp marker

图1 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 编码基因的 PCR 扩增电泳

2.3 RmtB 重组菌的菌落 PCR 鉴定结果

由图 3 可知,4 个重组质粒中,只有 3 个 pRmtB1、pRmtB2 及 pRmtB4 中含有 *rmtB* 全基因。

2.4 RmtB 重组菌的双酶切鉴定结果

经菌落 PCT 鉴定阳性的重组质粒双酶切鉴定及结果见图 4。

2.5 RmtB 重组菌的序列分析鉴定结果

上述 3 个经菌落 PCR 及双酶切鉴定呈阳性的重组菌,送上海英俊生物技术有限公司进行序列测定。测序结果用 DNASTar 6.0 与 GenBank 上下载的序列进行 MegAlign。结果证实,16S rRNA 甲基化酶 RmtB 成功转入大肠杆菌 JM109 中。

2.6 RmtB 重组菌的药物敏感性检测结果

RmtB 重组菌对 10 种药物的 MICs,由表 2 可知,3 株重组

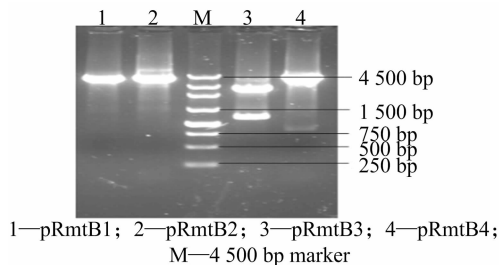


图2 RmtB 重组质粒 DNA 电泳结果

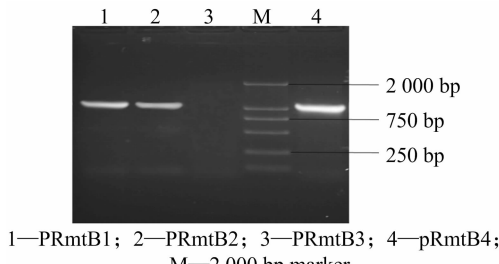


图3 重组质粒菌落 PCR 鉴定结果

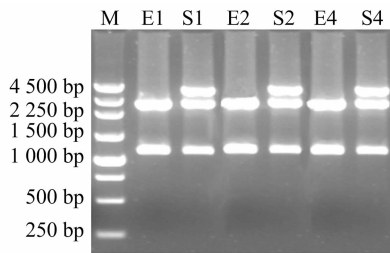


图4 RmtB 重组菌双酶切鉴定结果  
M—4 500 bp marker; E1 和 S1、E2 和 S2、E4 和 S4 分别为 pRmtB1、pRmtB2、pRmtB4 的双酶切鉴定结果

菌均对阿米卡星、庆大霉素及氨苄西林耐药。

### 2.7 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 重组菌稳定性研究结果

16S rRNA 甲基化酶 RmtB 重组菌 pRmtB1、pRmtB2 及 pRmtB4 在无抗生素筛选压力下,连续传 3 代后的生长曲线及药敏试验结果,由图 5 及表 3 可知,重组菌 pRmtB1 对阿米卡星及庆大霉素仍然高度耐药,其 MIC 分别为  $>1\,024\,\mu\text{g/mL}$  及  $512\,\mu\text{g/mL}$ 。而 pRmtB2 及 pRmtB4 对阿米卡星及庆大霉素的 MIC 均为  $4\,\mu\text{g/mL}$ 。

表 2 重组菌对 10 种药物的 MICs

菌株	$\mu\text{g/mL}$									
	阿米卡星	庆大霉素	氟苯尼考	恩诺沙星	氨苄西林	多西环素	头孢唑啉	氯霉素	新霉素	大观霉素
质控菌	2	4	4	0.125	8	2	1	2	4	8
pRmtB1	$>1\,024$	512	2	0.125	$>256$	1	1	2	4	4
pRmtB2	$>1\,024$	512	2	0.125	$>256$	1	1	2	4	4
pRmtB4	$>1\,024$	512	2	0.125	$>256$	1	1	2	4	4

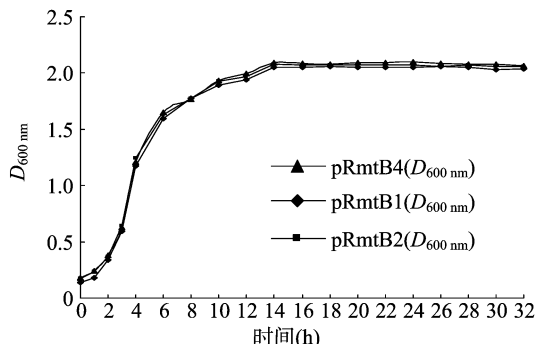


图5 重组菌的生长曲线

### 3 分析和讨论

近年来,各类抗生素及抗菌药物的耐药菌迅速发展,给临床治疗造成严重困难。目前,控制耐药菌感染,探索抗耐药菌药物采用的策略主要有:(1)筛选具有新作用机制(或新作用靶位)、新型化学结构的抗菌新药;(2)在作用机制、耐药机制与构效关系等研究成就的指导下,修饰现有抗生素与抗菌药物的化学结构,寻找增强与保护抗菌药物性能和探索提高机体防御机能与减弱微生物病原性的物质。其中,探索具有新型化学结构,新作用机制的新药是克服当前细菌耐药性的有效途径之一。但由于新药研发的成本较高、时间较长,因此近

表 3 RmtB 重组菌连续传 3 代以后对 10 种药物的 MICs

菌株	$\mu\text{g/mL}$									
	阿米卡星	庆大霉素	氟苯尼考	恩诺沙星	氨苄西林	多西环素	头孢唑啉	氯霉素	新霉素	大观霉素
质控菌	2	4	4	0.125	8	2	1	2	4	8
pRmtB1	$>1\,024$	512	2	0.125	$>256$	1	1	2	4	4
pRmtB2	4 *	4 *	2	0.125	$>256$	1	1	2	4	4
pRmtB4	4 *	4 *	2	0.125	$>256$	1	1	1	4	4

注:“\*”表示重组菌 pRmtB2 和 pRmtB4 经过传代 3 次以后对丁胺卡那霉素和庆大霉素的耐药性消失。

年来,新药上市的种类越来越少、速度越来越慢。而且,新药研发的速度往往赶不上耐药性产生的速度,如近年来上市的噁唑烷酮类化合物利奈唑胺,在临床治疗革兰阳性菌感染中具有重要意义,于 2000 年在美国首次上市,2007 年 8 月在中国上市。但该药全球上市不久,一种介导葡萄球菌对其耐药的核糖体 RNA 甲基化酶 Cfr 就出现,导致该药在临床上的应用价值大打折扣。因此,针对耐药机制寻找增强与保护抗菌药物性能和探索提高机体防御机能与减弱微生物病原性的物质,在抗耐药菌新药研发中的地位尤显突出。

本研究应用分子克隆技术构建了 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 重组菌,并对重组菌进行了稳定性研究。结果表明,16S rRNA 甲基化酶 RmtB 重组菌 pRmtB1 比较稳定,连传 3 代以后对丁胺卡那霉素及庆大霉素仍然高度耐药,其 MIC 分别为  $>1\,024\,\mu\text{g/mL}$ 、 $512\,\mu\text{g/mL}$ 。而 pRmtB2、pRmtB4 传代的过程中,对丁胺卡那霉素及庆大霉素的敏感性恢复,其 MIC 均为  $4\,\mu\text{g/mL}$ 。研究结果表明,16S rRNA 甲基化酶 RmtB 重组菌 pRmtB1 稳定性较强,可作为 16S rRNA 甲基化酶耐药抑制剂筛选模型。

张 铮,石青松,朱伟云,等. 乳酸菌发酵饲料对断奶仔猪生长性能和肠道健康的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):170-173.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.045

# 乳酸菌发酵饲料对断奶仔猪生长性能和肠道健康的影响

张 铮,石青松,朱伟云,毛胜勇

(南京农业大学动物科技学院/江苏省消化道营养与动物健康重点实验室/南京农业大学消化道微生物实验室,江苏南京 210095)

**摘要:**为研究乳酸菌发酵饲料对断奶仔猪生长性能和小肠健康的影响,试验选取 48 头 28 日龄体况良好、体质量相近的杜长大三元杂交断奶仔猪,随机分成 2 组,每组 4 个重复。对照组仔猪饲喂无抗乳猪全价配合饲料,试验组仔猪饲喂添加 20% 乳酸菌发酵饲料的全价料,试验共持续 29 d。结果表明,与对照组比较,饲喂添加发酵饲料的全价料显著提高平均日采食量,但对仔猪免疫器官质量及其脏器指数无显著影响,饲喂发酵饲料显著降低仔猪胃、回肠及结肠食糜的 pH 值,显著提高仔猪结肠中乙酸含量,对仔猪空肠和回肠的肠绒毛高度、隐窝深度以及二者之比无显著性影响,显著提高仔猪粪便中的乳酸菌数量和降低大肠杆菌的数量,对沙门氏菌的数量无显著影响。结果表明,乳酸菌发酵饲料对断奶仔猪肠道微生物组成有改善效果,但对生长性能和形态学指标无明显影响。

**关键词:**乳酸菌;发酵饲料;断奶仔猪;生长性能;小肠健康

**中图分类号:** S828.5;S816.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0170-04

近年来,随着欧盟和许多国家开始限制和禁用抗生素,寻找高效安全的饲用抗生素替代品已成为畜牧业发展的当务之急。目前,微生态制剂和发酵饲料被认为是最有希望的饲用

收稿日期:2017-06-28

基金项目:江苏省科技计划(编号:BE2016382)。

作者简介:张 铮(1994—),女,安徽马鞍山人,硕士研究生,从事单胃动物营养研究。E-mail:2016105045@njau.edu.cn。

通信作者:毛胜勇,博士,教授,博士生导师,从事动物营养研究。E-mail:maoshengyong@163.com。

## 4 结论

本研究应用分子克隆技术构建了 16S rRNA 甲基化酶 RmtB 重组菌,稳定性试验结果表明,16S rRNA 甲基化酶 RmtB 重组菌 pRmtB1 稳定性较强,可作为 16S rRNA 甲基化酶耐药抑制剂筛选模型。

## 参考文献:

- [1] Chen L, Chen Z L, Liu J H, et al. Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 59(5): 880-885.
- [2] 陈 琳,张俊丰,刘健华,等. rmtB 阳性猪大肠埃希氏菌中氨基糖苷钝化酶分析[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(12): 31-35.
- [3] Yu F, Wang L, Pan J, et al. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese teaching hospital: coexistence of rmtB and armA genes in the same isolate[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2009, 64(1): 57-63.
- [4] Morel F, Decousser J W, Kumanski S, et al. Association of the 16S rRNA methylase gene rmtB with a novel insertion sequence element belonging to the ISL3 family [J]. International Journal of

抗生素替代品,但在生产中发现,微生态制剂实际应用效果不稳定,且其产品的货架期较短。发酵饲料作为一种绿色、环保的新型饲料,目前已成为动物营养研究热点。在众多发酵饲料中,乳酸菌发酵饲料因具有替代或部分替代抗生素的潜力而受到广泛关注。研究发现,乳酸菌发酵饲料不仅含有大量活性益生菌,还含有大量的益生菌等活菌与代谢产物<sup>[1]</sup>,同时乳酸菌在生长过程中还可以消除饲料中的抗营养因子,将大分子蛋白分解为活性肽或游离氨基酸,对饲料起到预消化作用<sup>[2]</sup>。此外,乳酸菌还是多种动物消化道的共生菌,乳酸

Antimicrobial Agents, 2017, 49(1): 117-118.

- [5] Li D X, Zhang S M, Hu G Z, et al. Tn3-associated rmtB together with qnrS1, aac(6')-Ib-cr and bla CTX-M-15 are co-located on an F49A-B-plasmid in an *Escherichia coli* ST10 strain in China[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(1): 236-238.
- [6] Yao Q, Zeng Z, Hou J, et al. Dissemination of the rmtB gene carried on IncF and IncN plasmids among Enterobacteriaceae in a pig farm and its environment[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 66(11): 2475-2479.
- [7] Habeeb M A, Haque A, Nematzadeh S, et al. High prevalence of 16S rRNA methylase RmtB among CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from Islamabad, Pakistan[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2013, 41(6): 524-526.
- [8] 区炳明,陈 琳,宋玉洁,等. 临床 16S rRNA 甲基化酶的研究新进展[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(4): 669-684.
- [9] 黄留玉. PCR 最新技术原理、方法及应用[J]. 北京:化学工业出版社, 2011.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 北京:化学工业出版社, 2008.