

外膜蛋白 OmpU 对副溶血弧菌耐药性的影响

孟祥宇¹, 王建莉³, 黄丹阳², 周晴¹, 檀昕², 王小元^{*1,2,3}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了研究外膜蛋白 OmpU 对副溶血弧菌耐药性的影响, 作者构建了副溶血弧菌中高丰度外膜蛋白 OmpU 缺失的突变株 $\Delta ompU$ 。通过最小抑菌浓度(MIC)检测发现 $\Delta ompU$ 对 12 种抗生素的耐药性发生变化, 其中对氨苄青霉素的耐药性增加幅度最高。定量反转录 PCR 显示, 在氨苄青霉素刺激下, 野生型副溶血弧菌与 $\Delta ompU$ 中肽聚糖合成基因转录水平普遍下调, 而编码 β 内酰胺酶的基因 *VP_RS17515* 在野生型中转录水平高于 $\Delta ompU$ 。结果表明, 副溶血弧菌通过表达 β 内酰胺酶并降低肽聚糖合成速度的方式应对氨苄青霉素刺激, 而 OmpU 通过改变细胞膜通透性来影响氨苄青霉素的渗入。

关键词: 副溶血弧菌; 外膜蛋白; 氨苄青霉素; 耐药机制

中图分类号: Q 93 文章编号: 1673-1689(2023)12-0062-10 DOI: 10.12441/spyswjs.20210907001

Effect of OmpU on Antibiotics Resistance of *Vibrio parahaemolyticus*

MENG Xiangyu¹, WANG Jianli³, HUANG Danyang², ZHOU Qing¹, TAN Xin², WANG Xiaoyuan^{*1,2,3}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: For understanding the effect of OmpU on antibiotics resistance of *Vibrio parahaemolyticus*, a deletion mutant strain of the highly abundant outer membrane protein(OmpU) in *Vibrio parahaemolyticus*, designated as $\Delta ompU$, was constructed in this study. Minimum inhibitory concentration (MIC) assay revealed altered antibiotic resistances of $\Delta ompU$ to 12 antibiotics, with the highest increase observed in resistance to ampicillin. Quantitative reverse transcription PCR showed a general downregulation in the transcription level of peptidoglycan synthesis genes in both wild-type (WT) and $\Delta ompU$ cells under ampicillin stimulation. However, the gene *VP_RS17515* encoding β -lactamase exhibited the higher transcription level in WT strains than $\Delta ompU$. The results suggest that *V. parahaemolyticus* responds to ampicillin through expressing β -lactamase and reducing peptidoglycan synthesis rates, while OmpU changes the cell membrane permeability to affect the penetration of ampicillin.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, outer membrane protein, ampicillin, antibiotic resistance mechanism

收稿日期: 2021-09-07 修回日期: 2021-11-15

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1600102)。

* 通信作者: 王小元(1965—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物细胞膜和细胞壁关键分子组成、结构及功能研究。

E-mail: xwang@jiangnan.edu.cn

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性食源性致病菌,可引起胃肠炎、伤口感染和败血症^[1]。普遍存在于虾、蛤和鱿鱼等海产品中^[2],可造成重大的经济损失^[3]。由于抗生素的过度使用,近年来世界多地分离出耐药副溶血弧菌,造成新的食品安全隐患^[1-2]。

革兰氏阴性细菌外膜蛋白调节很多分子的胞内外转运^[4],与细菌耐药性密切相关^[5],但机制尚不完全清楚。外膜蛋白数量众多,但其丰度差别较大。比如,在含有质量分数 1% NaCl 的培养基中,霍乱弧菌外膜蛋白 OmpU 占总外膜蛋白质量的 30%;而在不含 NaCl 的培养基中,OmpU 质量分数高达 60%^[6]。OmpU 缺失的副溶血弧菌对胆汁盐敏感,但对多黏菌素耐受增强^[7]。副溶血弧菌中促进毒力基因 *tdh2* 表达的 ToxRS^[8]对 *ompU* 基因起到正调控作用^[9],说明 OmpU 与致病能力相关。OmpU 还是不同弧菌之间的保守抗原^[10]。副溶血弧菌至少含有 101 个外膜蛋白基因^[11],其中外膜蛋白对菌株耐药性影响的研究较为缺乏。

作者主要针对副溶血弧菌外膜蛋白 OmpU 对细菌耐药性的影响展开研究。通过 MIC 检测探究副溶血弧菌突变株 $\Delta ompU$ 对 12 种抗生素的耐药性差异。

1 材料与方法

1.1 菌株的培养

在副溶血弧菌 ATCC33846 中进行菌株构建,使用的菌株见表 1,引物见表 2。无特殊说明时,所有菌株的培养均采用 LB 培养基(10 g/L 蛋白胨、10 g/L NaCl、5 g/L 酵母浸提物)。在 37 ℃以 200 r/min 进行液体培养。在第二次同源重组和去除质粒的过程中使用 LB 蔗糖培养基,即正常 LB 培养基中添加 100 g/L 蔗糖。每次实验前,于 LB 平板划线活化 25 h,试管培养 14 h,菌液用于各实验。

生长曲线实验过程:按照初始 OD₆₀₀ 为 0.02,取过夜培养的菌液接入 50 mL LB 液体培养基。培养条件为 37 ℃、200 r/min。前 12 h 每隔 2 h 取样,后 18 h 每隔 3 h 取样。设置 3 组平行。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株与质粒		描述	来源
菌株	ATCC33846	副溶血弧菌(野生型)	ATCC
	CC118(λpir)	携带 λpir 基因的 CC118	本研究
	S17-1(λpir)	携带 λpir 基因的 S17-1	本研究
	ATCC33846 $\Delta ompU$	敲除 <i>ompU</i> (即 <i>VP_RS11975</i>)的 ATCC33846 突变株	本研究
质粒	pDS132	自杀质粒,具有氯霉素抗性基因	[12]
	pACYC184	含有 p15A 启动子,具有氯霉素与四环素抗性基因	ATCC
	pWJW101	含有 <i>loxL-Gm-loxR</i> ,具有庆大霉素抗性基因	[13]
	pDTW109	含有 <i>cre</i> ,具有庆大霉素抗性基因	[14]
	pOTC	含有 <i>cre</i> 与 <i>oriT</i> ,具有氯霉素抗性基因	本研究
	pOTC- <i>sacB</i>	由 pOTC 整合 <i>sacB</i> 而来,具有氯霉素抗性基因	本研究
	p $\Delta ompU$	pDS132 质粒上携带 <i>ompU</i> 同源臂片段和两端带有 <i>loxP</i> 位点的 <i>Gm</i> (庆大霉素抗性基因)片段,具有氯霉素与庆大霉素抗性基因	本研究

表 2 研究中使用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	序列(5'-3')
<i>Ptac-cre-F</i>	TTGGATACACCAAGGAAAGTGGTACCTGAACGACCCCGAATATTGG
<i>Ptac-cre-R</i>	ACAGATGTAGGTGTTCCACACTGCAGCTAATCGCCATCTTCCAGCA

续表 2

引物名称	序列(5'-3')
<i>traJ-oriT</i> -F	CACTAGTTCGGGTCGGGTGAATCTT
<i>traJ-oriT</i> -R	ACTTTCCTTGGTGTATCC
<i>CmR-p15A</i> -F	TGTGGAACACCTACATCTG
<i>CmR-p15A</i> -R	CACTAGTATCGTATGGGGCTGACTT
<i>sacB</i> -F	CAGCGCTAGCGGAGTGTATACCACCTTTATGTTGATAAGAAATAAAAGAAA
<i>sacB</i> -R	CAACATAGTAAGCCAGTATACGGATCGATCCTTTTAAACCCATC
<i>GmR</i> -R	CGTAATACGACTCACTATAGGGC
<i>GmR</i> -F	GCCCAATTAACCCCTACTAAAG
<i>ompU</i> -U-F	AATCTAGAGCCTTCCATCTTGCCGAT
<i>ompU</i> -U-R	GCCCTATAGTGAGTCGTATTACGTTGTATGGGGGAGAGATG
<i>ompU</i> -D-F	CTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCAATACTCAGTGCCCGCTT
<i>ompU</i> -D-R	AATCTAGAGGCTCTTTGAATCGTCTTAG
RT-16srRNA-F	TAATACGGAGGGTGCGAGC
RT-16srRNA-R	CACCGCTACACCTGAAATTCT
RT-VP_RS11975-F	GCATCGTTTAGTTTGGCG
RT-VP_RS11975-R	AGGCGTTATCACTGATTTACACAG
RT-VP_RS22195-F	CTAAGCAACCAAGTTAGCCAAC
RT-VP_RS22195-R	TTCTTCTTGAGCAGCCATTG
RT-VP_RS23020-F	AGTTGAATCTCGCCGTAAAT
RT-VP_RS23020-R	CTGCTGGTTCTGCTTTTCG
RT-VP_RS16800-F	TGCTACATCGCCATCAGC
RT-VP_RS16800-R	GCATCAACTACCGCTTCTTG
RT-VP_RS16465-F	GCTGGTGACGAGAAAGACT
RT-VP_RS16465-R	TTGAAGCCGATACCGAAG
RT-VP_RS20840-F	CAACAGGCTCACTAGGTGCT
RT-VP_RS20840-R	TTTGCGTCCATATCGTCC
RT-VP_RS03765-F	CTCAAACATATCGGCACTGGT
RT-VP_RS03765-R	TTGCTTGTGGGTGCTC
RT-VP_RS11205-F	CGTAAGCGATTTTCTGTGC
RT-VP_RS11205-R	AAAGCGGCTGGGATTGG
RT-VP_RS17515-F	GCTTGTCGGTTTGTGTATCCC
RT-VP_RS17515-R	TGCTCAACTGTTAGTTACGCCTC
RT-VP_RS13510-F	AATCATTGCTCGTTACCACAG
RT-VP_RS13510-R	CCGACGTATAGGCTTTCTCTTC
RT- <i>mrcB</i> -F	GCGACAGAAGACCGAGAT
RT- <i>mrcB</i> -R	CGTTAAGGTACTGCCACCT
RT-VP_RS02165-F	TCGCTTACCGTGCCATC
RT-VP_RS02165-R	TTTTACATCCAGCATCACCAC
RT- <i>mrdA</i> -F	GTTTTGATGGGCTTGCTG
RT- <i>mrd</i> -R	CCACTTTGATGCGGTTGT
RT-VP_RS21250-F	TTGACGGGATGAAAACGG
RT-VP_RS21250-R	AACAACGCGATAAGGCG

续表 2

引物名称	序列(5'-3')
RT-VP_RS22785-F	TGGCATCCAAACCTCACC
RT-VP_RS22785-R	CTTGAAGACTTTCTCGCTGT
RT-dacB-F	AGACCAACTATTTCCACCTG
RT-dacB-R	AGTAGATAACGGCATCGG
RT-VP_RS22200-F	ACGCCACCTGCGTCTATT
RT-VP_RS22200-R	CATTCCGATGCCGAAATC
RT-VP_RS09310-F	TAATGACGGCACTTATGGT
RT-VP_RS09310-R	ACAGACAACCTGCTCTACGG

1.2 质粒构建

pOTC 质粒构建:使用引物 *Cm-p15A-F*、*Cm-p15A-R* 与模板 pACYC184,扩增 *CmR* 与 *p15A* 基因获得片段 1。使用引物 *traJ-oriT-F*、*traJ-oriT-R* 与模板 pDS132,扩增 *traJ* 与 *oriT* 基因获得片段 2。使用 *Spe* I 消化片段 1 和 2。使用引物 *Ptac-cre-F*、*Ptac-cre-R* 与模板 pWJW102^[13],扩增 *cre* 基因获得片段 3。片段 1 和 2 经 T4 连接酶连接后,通过一步克隆试剂盒与片段 3 连接,获得环化质粒 pOTC,即含有 *oriT* 与 *cre* 基因。

pOTC 只能通过无抗多次传代去除质粒,因此构建含有 *sacB* 基因的 pOTC-*sacB* 质粒。使用引物 *sacB-F*、*sacB-R* 与模板 pDS132 来扩增 *sacB* 基因片段。使用一步克隆试剂盒将 *sacB* 基因片段与 *Bst*Z17 I 线性化的 pOTC 连接。

所有质粒构建时使用大肠杆菌 CC118(λ pir),最终将构建完成的质粒转化至大肠杆菌 S17-1(λ pir)备用。

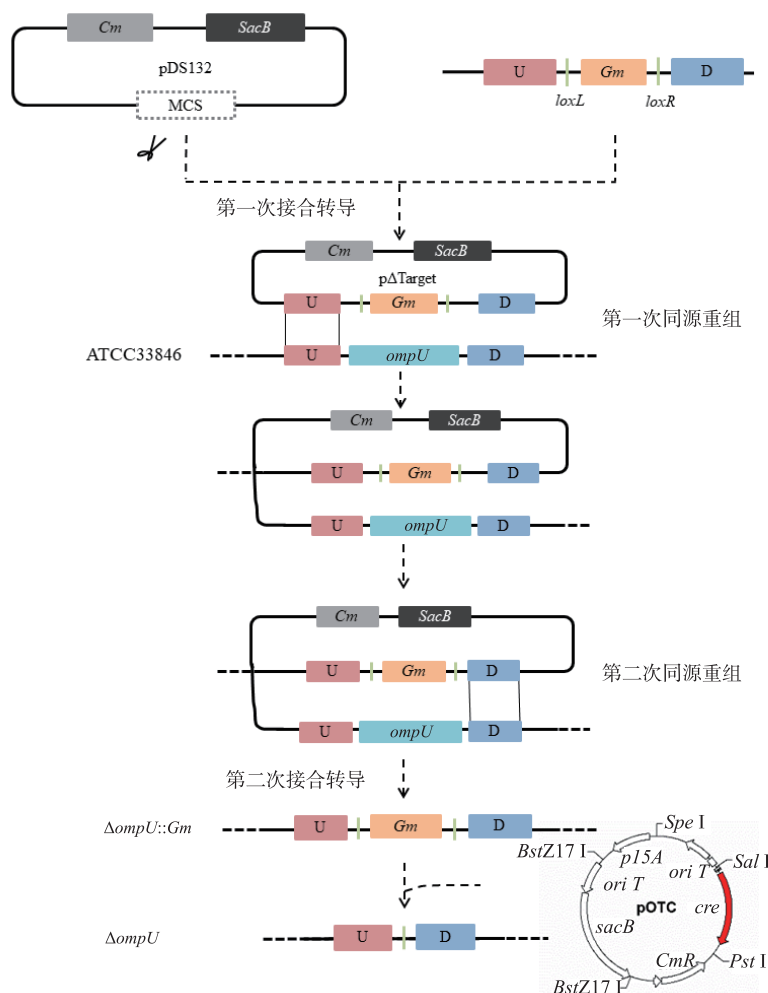
1.3 突变菌株 Δ ompU 构建

利用副溶血弧菌自身具有的同源重组系统,含有同源臂的自杀质粒 pDS132 进入细胞后会整合到基因组上。引入 Cre/loxP 系统,在敲除同源臂之间加入带有 *loxP* 位点的庆大霉素抗性片段,之后该抗性片段通过 Cre 酶去除,以提高敲除效率。敲除流程见图 1。

使用引物 *ompU-U-F*、*ompU-U-R*、*ompU-D-F*、*ompU-D-R* 对副溶血弧菌 ATCC33846 基因组扩增,分别得到上游与下游同源臂。使用引物 *Gm-R*、*Gm-F* 和模板 pWJW101^[13],扩增 *loxL-Gm-loxR* 片段。通过融合 PCR 将上游同源臂、*loxL-Gm-loxR*、下游同源臂整合。融合产物与 pDS132 经过 *Xba* I 酶切后连接,获得 *ompU* 基因敲除质粒 p Δ ompU。

通过接合转导实验将 p Δ ompU 导入副溶血弧菌中。分别将含有 p Δ ompU 的大肠杆菌 S17-1(λ pir)与副溶血弧菌 ATCC33846 培养至 OD₆₀₀ 为 1.0。各取 1 mL 菌液离心并用灭菌的 LB 液体培养基清洗沉淀两次后,使用 100 μ L LB 液体培养基共悬浮,点种于 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。使用无菌棉签刮下菌苔悬浮于 1 mL LB 液体培养基中,涂布于含 5 mg/L 多黏菌素 B 与 10 mg/L 氯霉素的双抗平板上。验证正确的菌落显示两条条带:一条长度为质粒上同源臂和庆大霉素抗性基因的长度,另一条长度为基因组上同源臂与 *ompU* 基因的长度。将正确的菌株接种于含有 30 mg/L 庆大霉素的 LB 蔗糖试管中。取 50 μ L 菌液涂布于含有 30 mg/L 庆大霉素的 LB 蔗糖平板上,长出的正确菌落基因型为 Δ ompU::Gm。

将含有 pOTC-*sacB* 的大肠杆菌 S17-1(λ pir)与 Δ ompU::Gm 进行接合转导实验。菌落将呈现 3 种琼脂糖凝胶电泳结果,第一种为只有一条长度为同源臂和庆大霉素抗性基因的条带,第二种为只有一条长度为同源臂和 *loxP* 位点(约 100 bp)的条带,第三种为出现以上两种条带。将第一种和第三种菌落挑取至含有 30 mg/L 氯霉素的 LB 液体培养基中培养,使 Cre 进一步发挥切割作用。并再次涂布于含有 30 mg/L 氯霉素的 LB 平板上进行单菌落验证。将第二种菌落划线接种至含有 30 mg/L 庆大霉素的 LB 平板进行负筛选。筛选得到的菌株培养于 LB 蔗糖试管,并涂布于 LB 蔗糖平板。单菌落划线接种至含有 30 mg/L 氯霉素的 LB 平板进行负筛选。筛选得到的菌株为去除庆大霉素抗性基因和 pOTC-*sacB* 质粒的突变株 Δ ompU。 Δ ompU 与野生型均在 LB 平板上划线纯化 5 次后用于后续实验。

图1 副溶血弧菌 *ompU* 缺失突变菌的构建流程Fig. 1 Construction process of *V. parahaemolyticus ompU* deletion mutant

1.4 渗透性测定

将过夜培养的菌液调整至 OD_{600} 为 0.5, 用 pH 7.4 的 10 mmol/L PBS 缓冲液清洗菌体 2 次并悬浮菌体。放入荧光分光光度计之前, 向 1 152 μ L 菌液中加入 48 μ L 的 10 μ mol/L N-苯基-1-萘胺 (N-phenyl-1-naphthylamine, NPN) 溶液, 颠倒混匀后使用石英比色皿检测。设置激发光波长 350 nm, 发射光波长 428 nm, 狭缝宽度 2.5 mm。读取并记录发射光波长 428 nm 下的荧光值。设 3 组生物学重复, 每组 3 个平行。

1.5 MIC 测定

使用 96 孔板进行该实验。利用二倍稀释法将每孔的抗生素质量浓度调整为对应质量浓度, 稀释区间为 0.007 812 5~8 192 mg/L。取过夜培养的菌

液, 调整 OD_{600} 为 0.02, 接入新液体培养基培养 5 h。调整菌体浓度为 1×10^6 CFU/mL, 每孔加入 100 μ L 菌液。37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。每种抗生素至少两组生物学重复, 每组 3 个平行。

1.6 定量逆转录 PCR 检测

取过夜培养的菌液转接至新的 LB 液体培养基, 调整 OD_{600} 为 0.02。在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养 4 h 后吸出一半菌液至无菌空试管中。实验组加入终质量浓度为 16 mg/L 的氨苄青霉素, 对照组加入同等体积的无菌水。在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养 0.5 h 获得样品。将样品离心弃上清液后提取 RNA 并进行反转录, 使用表 2 中的 RT 引物进行定量逆转录 PCR (RT-qPCR) 检测^[15]。设 3 组生物学重复。

2 结果与讨论

2.1 外膜蛋白 OmpU 对副溶血弧菌生长、膜渗透性及其他外膜蛋白转录水平的影响

细菌生长具有迟缓期、对数期、稳定期、衰亡期。迟缓期的细菌为了消化食物而产生新酶,并合成蛋白质等物质,为细胞分裂做准备^[16]。 $\Delta ompU$ 的迟缓期较野生型 ATCC33846 明显缩短 (见图 2(a))。这也许是因为 OmpU 是细菌在迟缓期准备的蛋白质之一,缺失后减轻了细胞迟缓期的准备负担。

对 $\Delta ompU$ 进行外膜渗透性实验 (见图 2(b))。采用 NPN 探针法,当 NPN 结合到内膜疏水环境中可被激发形成绿色荧光,由此可以看出外膜的渗透能力^[17]。与野生型相比, $\Delta ompU$ 渗透性降低,即 OmpU 缺失后通过外膜并结合到内膜上的 NPN 减少。OmpU 为其主要的外膜孔蛋白^[18]。另一方面,外膜渗透性下降也可能是 LPS 变得更加光滑造成的,

使疏水性分子更加难以通过膜渗透进入细胞。

为了检测 OmpU 敲除后对其他膜蛋白转录是否产生影响,选取 7 个外膜蛋白基因。其中 *VP_RS16800* 转录水平下调超出 3 倍 (见图 2(c))。*VP_RS16800* 表达 OmpV,OmpV 最先在霍乱弧菌中被发现,是一个肽聚糖相关外膜蛋白^[19]。OmpV 参与渗透调节机制,现已有多个研究经过蛋白质电泳验证表明,弧菌中 OmpV 的表达随着盐质量浓度升高而降低,而 OmpU 则具有相反的表达趋势^[20-22]。OmpV 可能对细胞在低盐环境中的适应起作用,而 OmpU 则可能对盐离子的流出起作用^[21]。OmpV 在无铁离子环境中表达上调,而 OmpU 则表现出相反的趋势^[20],并且铁摄取调控因子 Fur 可以结合 OmpU 启动子^[22]。在含质量分数 1%NaCl 的 LB 培养基中,OmpU 的缺失可能导致一定的离子流出损伤,OmpV 相应减少,以维持离子进出平衡。

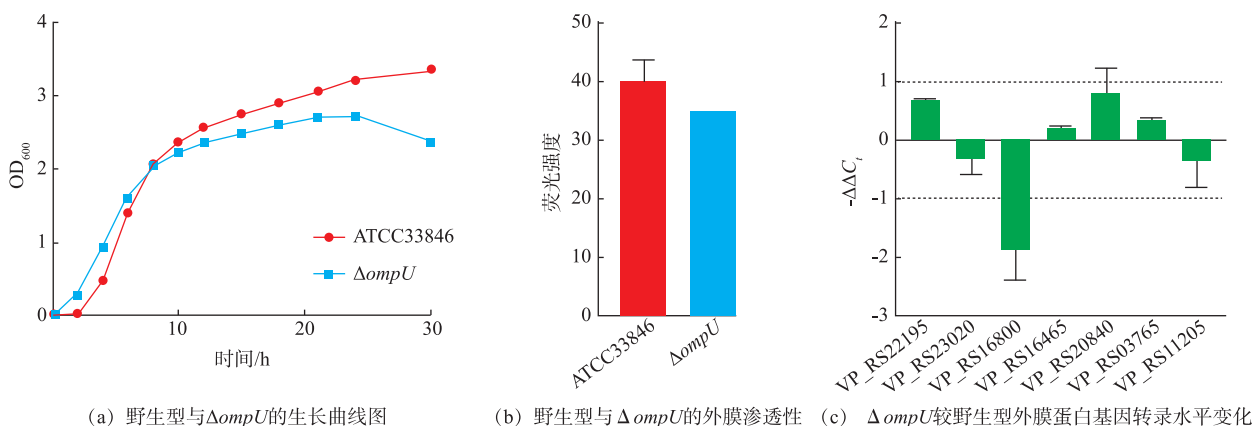


图 2 外膜蛋白 OmpU 对副溶血弧菌生长、膜渗透性及其他外膜蛋白转录水平的影响

Fig. 2 Effects of OmpU on growth, outer membrane permeability and other transcription of OMPs of *V. parahaemolyticus*

表 3 研究中涉及的基因介绍

Table 3 Introduction of genes related to this work

基因名称	描述
<i>VP_RS22195</i>	假定蛋白,与大肠杆菌胞壁脂蛋白 Lpp 具有 40.45%的相似性
<i>VP_RS23020</i>	麦芽糖孔蛋白
<i>VP_RS16800</i>	MipA/OmpV 家族蛋白
<i>VP_RS16465</i>	OmpA 家族蛋白
<i>VP_RS20840</i>	OmpA 家族蛋白
<i>VP_RS03765</i>	OmpA 家族蛋白
<i>VP_RS11205</i>	OmpH 家族外膜蛋白,与大肠杆菌周质伴侣蛋白 Skp 具有 36.42%的相似性
<i>VP_RS17515</i>	水解羧苄青霉素的 A 类 β -内酰胺酶 CARB-22,可以水解 β 内酰胺类抗生素 ^[23]
<i>VP_RS13510</i>	PBP1A 家族青霉素结合蛋白,细胞伸长所必需的肽聚糖合酶 ^[24]

续表 3

基因名称	描述
<i>mrcB</i>	青霉素结合蛋白 1B,细胞分裂所必需的肽聚糖合酶 ^[24]
<i>mrdA</i>	青霉素结合蛋白 2,细胞伸长所必需的转肽酶 ^[25]
<i>VP_RS02165</i>	青霉素结合蛋白 3,细胞分裂所必需的转肽酶 ^[25]
<i>VP_RS03450</i>	丝氨酸水解酶,分别与大肠杆菌 PBP5、PBP6、PBP7 具有 55.13%、51.52%、45.57%的相似性
<i>VP_RS22785</i>	<i>D</i> -丙氨酰- <i>D</i> -丙氨酸羧肽酶,可切割肽聚糖末端 <i>D</i> -Ala ^[26]
<i>dacB</i>	丝氨酸型 <i>D</i> -Ala- <i>D</i> -Ala 羧肽酶,可切割肽聚糖中的末端 <i>D</i> -Ala ^[25]
<i>VP_RS22200</i>	<i>L</i> , <i>D</i> -转肽酶家族蛋白
<i>VP_RS09310 VP_RS15980</i>	<i>L</i> , <i>D</i> -转肽酶家族蛋白,形成 mDAP ³ -mDAP ³ 交联 ^[25]

2.2 外膜蛋白 OmpU 对副溶血弧菌耐药性的影响

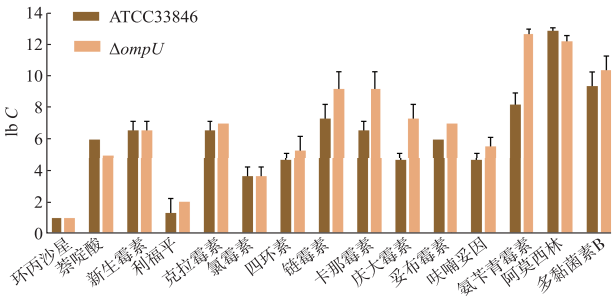
为进一步了解 OmpU 在抗生素耐药中的作用,进行 15 种抗生素的 MIC 实验 (见图 3)。其中 $\Delta ompU$ 较野生型耐药性无变化的是氯霉素、环丙沙星和新生霉素,耐药性降低的有阿莫西林和萘啶酸,增长的有利福平、克拉霉素、四环素、妥布霉素、呋喃妥因、多黏菌素 B、链霉素、卡那霉素、庆大霉素和氨苄青霉素。 $\Delta ompU$ 对多种抗生素呈现出更耐药的表现说明 OmpU 在细胞对抗生素的敏感性中发挥一定的作用。

其中,属于氨基糖苷类抗生素的链霉素、卡那霉素、庆大霉素的 MIC 明显提高。氨基糖苷类抗生素除了抑制蛋白质翻译^[27],还因为在生理 pH 下为多阳离子状态,可与外膜脂多糖层的二价阳离子置换,从而增加膜的通透性^[28]。庆大霉素和多黏菌素 B 通过静电相互作用插入到 LPS 中,使 LPS 产生大量缺陷^[29]。除此之外,氨基糖苷类抗生素通过外膜孔蛋白进入菌体,细菌通过调低外膜孔蛋白的表达量达到降低外膜渗透性的目的,从而对氨基糖苷类抗生素耐受^[27]。对多黏菌素 B 的耐药性增加说明 $\Delta ompU$ 外膜对阳离子抗菌肽的抵御能力增加,这可能是氨基糖苷类抗生素 MIC 增加的原因之一。同时, $\Delta ompU$ 的外膜渗透性减弱也是原因之一。

抗生素的亲/疏水性也是影响耐药性变化的原因之一。克拉霉素、四环素、氯霉素和利福平溶于甲醇或乙醇中,属于极性较小的分子。疏水性更强的新生霉素、利福平等抗生素可以插入松弛的 LPS 单层中^[29]。在卡他莫拉菌中,大环内酯类很容易进入粗糙型 LPS 的细胞中,而在具有光滑型 LPS 的细胞中未观察到大环内酯类的积累^[30]。 $\Delta ompU$ 外膜对疏水性物质的渗透性减小,这可能是这些抗生素 MIC 轻

微增加的原因。

近年来,副溶血弧菌分离株显示出对氨苄青霉素耐药性的增加,韩国海岸分离出的副溶血弧菌中 10.6%对氨苄青霉素敏感,87.2%为耐药菌株^[31]。野生型具有较低的氨苄青霉素 MIC,推测可能是由于实验室经多次无抗传代造成氨苄青霉素抗性退化。而野生型对氨苄青霉素和阿莫西林耐药性不同的原因可能是 CARB 内酰胺酶对不同 β 内酰胺类抗生素的水解速率不同^[32]。而 $\Delta ompU$ 对这两种 β 内酰胺类抗生素均表现为耐药,并且 $\Delta ompU$ 的外膜渗透性降低。说明 OmpU 对 β 内酰胺类抗生素渗透进入细胞起到一定的作用。霍乱弧菌具有氨苄青霉素耐药性的原因之一是 OmpU 的表达降低^[33]。氨苄青霉素通过孔蛋白进入细胞^[31,34]。然而 OmpU 对先锋霉素 II 的渗透能力低于 OmpT^[35]。这说明存在其他外膜蛋白在 β 内酰胺类抗生素渗透进入细胞中发挥作用。



C 表示 MIC 除以 0.031 25 mg/L。

图 3 野生型与 $\Delta ompU$ 对 15 种抗生素的 MIC

Fig. 3 MICs of WT and $\Delta ompU$ to 15 antibiotics

2.3 外膜蛋白 OmpU 对氨苄青霉素的耐药机制初探

为了进一步研究 $\Delta ompU$ 对氨苄青霉素耐药性提高的原因,通过 RT-qPCR 观察 11 个基因的变化情况。这些基因分为 β 内酰胺酶基因和肽聚糖合成

相关基因(见表3)。 β 内酰胺酶由 VP_RS17515 表达。基因(VP_RS13510、mrcB、mrdA、VP_RS02165、VP_RS03450、VP_RS22785、dacB、VP_RS22200、VP_RS09310、VP_RS15980)表达产物分别与大肠杆菌 PBP1A、PBP1B、PBP2、PBP3、PBP5、PBP5、PBP4、LdtA、LdtD、LdtF 具有同源性,作为肽聚糖合成相关基因。PBPs 是青霉素结合蛋白,其中 PBP1A、PBP1B 具有转肽酶和糖基转移酶活性,PBP2、PBP3 只具有转肽酶活性,PBP4、PBP5 具有羧肽酶活性;Ldts 是一种非青霉素结合位点的转肽酶,形成 mDAP³-mDAP³ 之间的交联^[25]。 β 内酰胺类抗生素通过抑制青霉素结合蛋白,干扰细菌细胞壁的合成,从而抑制细菌的生长^[36]。根据生长曲线,使用生长 4 h 后进入对数期的菌液作为样品。野生型氨苄青霉素的 MIC 为 8~16 mg/L(见图3)。16 mg/L 氨苄青霉素作用后的野生型 ATCC33846 与 $\Delta ompU$ 基因转录水平变化情况见图4。相较于无处理组,野生型中 VP_RS17515 转录上调说明 β 内酰胺酶的表达是应对氨苄青霉素的措施之一,有研究者在副溶血弧菌 V110 中得到同样的结果^[37]。随着青霉素作用的时间增长,淋病奈瑟菌肽聚糖交联率下降^[38]。在野生型与 $\Delta ompU$ 中,肽聚糖合成相关基因普遍呈现轻微下调趋势,说明减少肽聚糖合成是另一种应对措施。

3 结 语

OmpU 为外膜上的一种高丰度蛋白质,作者使用 Cre/loxP 系统的改进敲除方法对 OmpU 进行高效敲除。OmpU 敲除后,生长曲线迟缓期缩短,外膜渗透性降低,对氨基糖苷类和氨苄青霉素等抗生素的耐药性增加。其中,渗透性降低是导致耐药水平增加的主要原因。除此之外,副溶血弧菌还通过表达

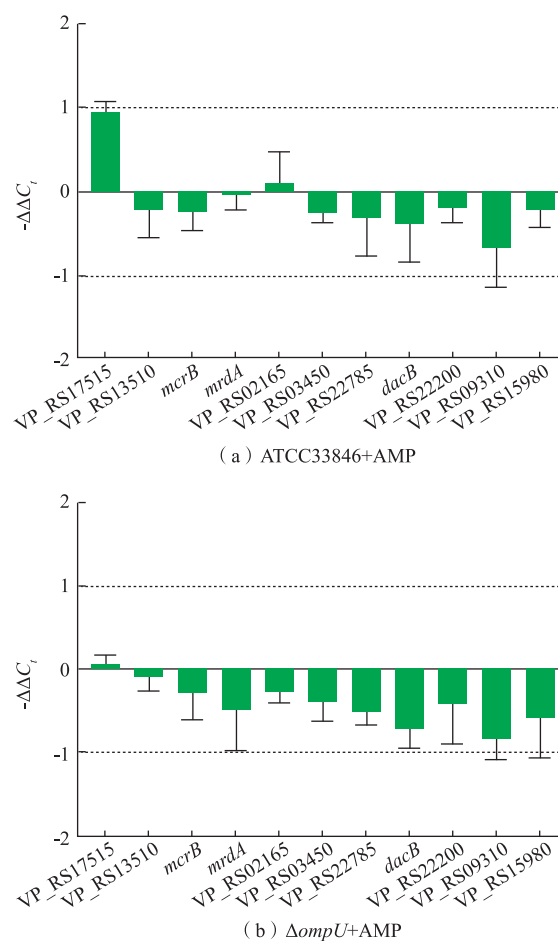


图4 野生型与 $\Delta ompU$ 中 11 种基因转录水平变化

Fig. 4 Changes in transcription levels of 11 genes in WT and $\Delta ompU$

β 内酰胺酶、降低肽聚糖合成活跃度等方式应对氨苄青霉素的刺激。初步研究了副溶血弧菌外膜蛋白 OmpU 在耐药性中发挥的作用。下一步将继续深入探索 OmpU 缺失对细胞外膜产生的影响,以及其他外膜蛋白对耐药性的影响。

参考文献:

- [1] ELMAHDI S, DASILVA L V, PARVEEN S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review[J]. **Food Microbiology**, 2016, 57: 128-134.
- [2] TAN C W, RUKAYADI Y, HASAN H N, et al. Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia[J]. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2020, 27(6): 1602-1608.
- [3] KUMAR V, BARUAH K, NGUYEN D V, et al. Phloroglucinol-mediated Hsp70 production in crustaceans: protection against *Vibrio parahaemolyticus* in *Artemia franciscana* and *Macrobrachium rosenbergii*[J]. **Frontiers in Immunology**, 2018, 9: 1091.
- [4] KOEBNIK R, LOCHER K P, VAN GELDER P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell [J]. **Molecular Microbiology**, 2000, 37(2): 239-253.

- [5] REDDY P N, MAKAM S S, KOTA R K, et al. Functional characterization of a broad and potent neutralizing monoclonal antibody directed against outer membrane protein (OMP) of *Salmonella typhimurium*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2020, 104(6): 2651-2661.
- [6] CHAKRABARTI S R, CHAUDHURI K, SEN K, et al. Porins of *Vibrio cholerae*: purification and characterization of OmpU[J]. **Journal of Bacteriology**, 1996, 178(2): 524-530.
- [7] HAINES-MENGES B, WHITAKER W B, BOYD E F. Alternative sigma factor RpoE is important for *Vibrio parahaemolyticus* cell envelope stress response and intestinal colonization[J]. **Infection and Immunity**, 2014, 82(9): 3667-3677.
- [8] LIN Z, KUMAGAI K, BABA K, et al. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* toxRS operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene[J]. **Journal of Bacteriology**, 1993, 175(12): 3844-3855.
- [9] WHITAKER W B, PARENT M A, BOYD A, et al. The *Vibrio parahaemolyticus* toxRS regulator is required for stress tolerance and colonization in a novel orogastric streptomycin-induced adult murine model[J]. **Infection and Immunity**, 2012, 80(5): 1834-1845.
- [10] 伦镜盛, 张设熙, 董亚萍, 等. 弧菌外膜蛋白 OmpU 的免疫交叉反应性和交叉保护性[J]. 微生物学报, 2016, 56(5): 867-879.
LUN J S, ZHANG S X, DONG Y P, et al. Immunological cross-reactivity and cross-protection of outer membrane protein OmpU among *Vibrio species*[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2016, 56(5): 867-879. (in Chinese)
- [11] WANG W B, LIU J X, GUO S S, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio* spp. specific outer membrane proteins by reverse vaccinology and surface proteome[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2020, 11: 625315.
- [12] HORNG Y T, CHANG K C, LIU Y N, et al. The RssB/RssA two-component system regulates biosynthesis of the tripyrrole antibiotic, prodigiosin, in *Serratia marcescens*[J]. **International Journal of Medical Microbiology**, 2010, 300(5): 304-312.
- [13] MILTON D L, NORQVIST A, WOLF-WATZ H. Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1992, 174(22): 7235-7244.
- [14] PHILIPPE N, ALCARAZ J P, COURSANGE E, et al. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria[J]. **Plasmid**, 2004, 51(3): 246-255.
- [15] WANG J L, MA W J, WANG Y Z, et al. Deletion of 76 genes relevant to flagella and pili formation to facilitate polyhydroxyalkanoate production in *Pseudomonas putida*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018, 102(24): 10523-10539.
- [16] HU J Y, TAN Y Z, LI Y Y, et al. Construction and application of an efficient multiple-gene-deletion system in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Plasmid**, 2013, 70(3): 303-313.
- [17] TAN X, QIAO J, ZHOU Q, et al. Identification of a phosphoethanolamine transferase for lipid A modification in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. **Food Control**, 2021, 125: 108033.
- [18] BERTRAND R L. Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division[J]. **Journal of Bacteriology**, 2019, 201(7): 1-21.
- [19] HELANDER I M, MATTILA-SANDHOLM T. Fluorometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2000, 88(2): 213-219.
- [20] PATHANIA M, ACOSTA-GUTIERREZ S, BHAMIDIMARRI S P, et al. Unusual constriction zones in the major porins OmpU and OmpT from *Vibrio cholerae*[J]. **Structure**, 2018, 26(5): 708-721.
- [21] STEVENSON G, LEAVESLEY D I, LAGNADO C A, et al. Purification of the 25-kDa *Vibrio cholerae* major outer-membrane protein and the molecular cloning of its gene: *ompV*[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1985, 148(2): 385-390.
- [22] XIONG X P, ZHANG B W, YANG M J, et al. Identification of vaccine candidates from differentially expressed outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* in response to NaCl and iron limitation[J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2010, 29(5): 810-816.
- [23] KAO D Y, CHENG Y C, KUO T Y, et al. Salt-responsive outer membrane proteins of *Vibrio anguillarum* serotype O1 as revealed by comparative proteome analysis[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2009, 106(6): 2079-2085.
- [24] LV T T, DAI F, ZHUANG Q T, et al. Outer membrane protein OmpU is related to iron balance in *Vibrio alginolyticus* [J]. **Microbiological Research**, 2020, 230: 126350.

- [25] PEMBERTON O A, NOOR R E, KUMAR M V V, et al. Mechanism of proton transfer in class A β -lactamase catalysis and inhibition by avibactam[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2020, 117(11): 5818-5825.
- [26] MARKOVSKI M, BOHRHUNTER J L, LUPOLI T J, et al. Cofactor bypass variants reveal a conformational control mechanism governing cell wall polymerase activity[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2016, 113(17): 4788-4793.
- [27] GARDE S, CHODISETTI P K, REDDY M. Peptidoglycan: structure, synthesis, and regulation[J]. **EcoSal Plus**, 2021, 9(2): 1-10.
- [28] SKOOG K, BRUZELL F S, DUCROUX A, et al. Penicillin-binding protein 5 can form a homo-oligomeric complex in the inner membrane of *Escherichia coli*[J]. **Protein Science: a Publication of the Protein Society**, 2011, 20(9): 1520-1529.
- [29] GARNEAU-TSODIKOVA S, LABBY K J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives[J]. **MedChemComm**, 2016, 7(1): 11-27.
- [30] SERIO A W, KEEPERS T, ANDREWS L, et al. Aminoglycoside revival: review of a historically important class of antimicrobials undergoing rejuvenation[J]. **EcoSal Plus**, 2018, 8(1): 1-12.
- [31] CETUK H, ANISHKIN A, SCOTT A J, et al. Partitioning of seven different classes of antibiotics into LPS monolayers supports three different permeation mechanisms through the outer bacterial membrane[J]. **Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids**, 2021, 37(4): 1372-1385.
- [32] TSUJIMOTO H, GOTOH N, NISHINO T. Diffusion of macrolide antibiotics through the outer membrane of *Moraxella catarrhalis* [J]. **Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy**, 1999, 5(4): 196-200.
- [33] RYU A R, MOK J S, LEE D E, et al. Occurrence, virulence, and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from bivalve shellfish farms along the southern coast of Korea[J]. **Environmental Science and Pollution Research International**, 2019, 26(20): 21034-21043.
- [34] CHOURY D, AUBERT G, SZAJNERT M F, et al. Characterization and nucleotide sequence of CARB-6, a new carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase from *Vibrio cholerae*[J]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1999, 43(2): 297-301.
- [35] NGUYEN D T, NGO T C, TRAN H H, et al. Two different mechanisms of ampicillin resistance operating in strains of *Vibrio cholerae* O1 independent of resistance genes[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2009, 298(1): 37-43.
- [36] GHAI I, BAJAJ H, ARUN B J, et al. Ampicillin permeation across OmpF, the major outer-membrane channel in *Escherichia coli* [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2018, 293(18): 7030-7037.
- [37] WIBBENMEYER J A, PROVENZANO D, LANDRY C F, et al. *Vibrio cholerae* OmpU and OmpT porins are differentially affected by bile[J]. **Infection and Immunity**, 2002, 70(1): 121-126.
- [38] ANGELIS G D, DEL G P, POSTERARO B, et al. Molecular mechanisms, epidemiology, and clinical importance of β -lactam resistance in *Enterobacteriaceae*[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020, 21(14): 5090.
- [39] CHIOU J C, LI R C, CHEN S. CARB-17 family of β -lactamases mediates intrinsic resistance to penicillins in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2015, 59(6): 3593-3595.
- [40] DOUGHERTY T J. Involvement of a change in penicillin target and peptidoglycan structure in low-level resistance to beta-lactam antibiotics in *Neisseria gonorrhoeae*[J]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1985, 28(1): 90-95.