

海洋病原细菌 *Enterobacter* sp. EM28-2P⁻ 存在 氯霉素磷酸化灭活机制*

孟繁梅, 汪 凯, 刘玉焕, 艾云灿

(中山大学有害生物控制及资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 报道1例非氯霉素产生菌中发现的氯霉素磷酸化灭活机制。海洋病原细菌 *Enterobacter* sp. EM28-2P⁻ (Cm^r, cat⁻, MIC=25 μg/mL) 接种在含25 μg/mL标准品 D-(-)-氯霉素 LB培养基中培养24 h后, 可生成磷酸化氯霉素。LC-MS分析检测出新生成3个离子峰 *m/z* 400.9, 402.8和404.9, 都是典型 [M+PO₃-H]⁻ 的特征指纹峰, 对应于氯霉素的C3位羟基磷酸化产物。

关键词: 海洋细菌; 氯霉素; 耐药性; 磷酸化; LC-MS分析

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 05-0119-02

氯霉素在大农业领域广泛应用造成环境中累积并进入食物链, 残留氯霉素严重危害食品安全, 成为近年绿色贸易壁垒制裁和重大国际贸易争端。氯霉素耐药性问题严重削弱氯霉素治疗效果。研究氯霉素代谢及耐药性机制, 具有重要理论意义和实践应用价值。氯霉素于1947年从 *Streptomyces venezuelae* 中分离, 化学结构新颖, 强力杀死大多数革兰氏阳性细菌和阴性细菌, 很快成为临床特效药^[1]。1964年首次发现大肠杆菌中存在氯霉素乙酰转移酶(CAT)介导酶灭活机制, 促进临床病原细菌耐药性机制研究成果丰富^[2]。新近又在抗生素生产菌 *S. venezuelae* 中发现唯一1例磷酸转移酶介导的磷酸化灭活机制^[3], 该酶X-射线衍射结构已确定^[4]。揭示了模式生产菌株特有的自我保护机制, 即缺乏乙酰转移酶时由磷酸转移酶补偿灭活, 它在进入氯霉素合成代谢阶段之前, 自身对氯霉素敏感不具备耐药性, 但是进入氯霉素合成代谢高峰阶段启动磷酸转移酶合成及磷酸化灭活机制来有效保护自己。这项新发现激励研究者追寻非氯霉素产生菌(被当作治疗对象)的病原细菌中是否存在类似机制, 目前未见文献报道。本文报道1例病原细菌的氯霉素磷酸化灭活机制。

1 菌种和培养基

供试菌株 *Enterobacter* sp. EM28-2P⁻ (Cm^r, cat⁻, MIC=25 μg/mL) 为本实验室保藏。参见文献[5]配方制作肉汤培养基(LB), LB用做摇瓶液体培养基时不加琼脂。含25 μg/mL标准品 D-(-)-氯霉素(Sigma公司)的LB培养基用作氯霉素代

谢产物检测试验。

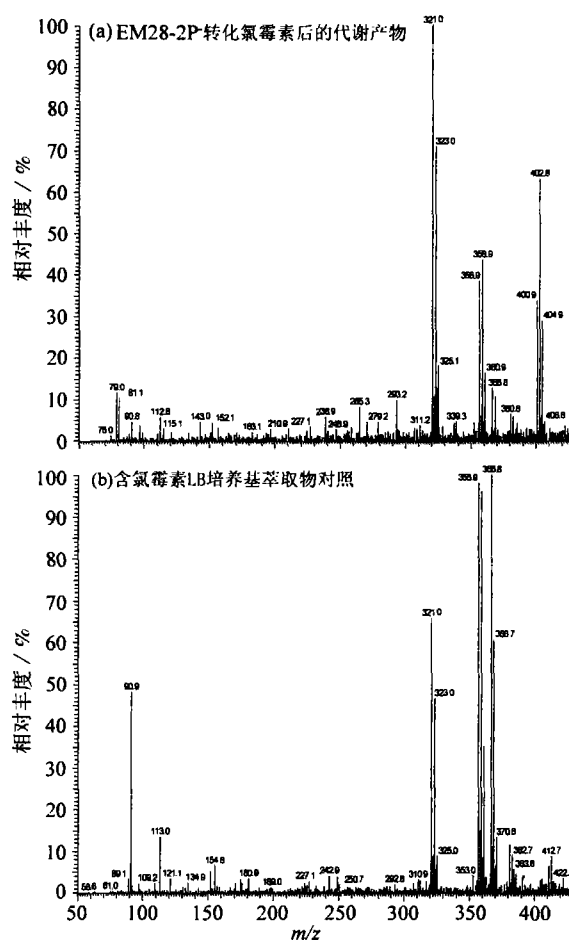


图1 EM28-2P⁻转化氯霉素的代谢物质谱
Fig.1 Mass spectrum of chloramphenicol metabolites by
EM28-2P⁻ obtained by negative ion spray

* 收稿日期: 2005-05-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40376046); 广东省科技计划重点资助项目(C32402); 广东省自然科学基金资助项目(031624; 031618); 教育部回国留学人员科研启动基金资助项目; 中山大学测试科学基金资助项目

作者简介: 孟繁梅(1965年生), 女, 讲师; 通讯联系人: 艾云灿; E-mail: ls08@zsu.edu.cn

2 方法与结果

纯种接入含 25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 5 mL LB 液体培养基中 22 $^{\circ}\text{C}$ 摇床震荡培养 24 h, 离心 8 000 r/min 10 min。取上清转移至 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 乙酸乙酯涡旋 10 min, 离心 5 000 r/min 5 min。准确吸取 20 mL 有机相转移至蒸发瓶中, 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转蒸发干燥, 再用 1 mL 流动相溶剂重新溶解。采用 ThermoFinnigan 公司 LCQ DECA XP LC-MS 高效液相色谱-质谱联用仪, 色谱柱 Hypersil GOLD (150 $\times$ 1.5 mm, 3 μm), 流动相 (体积比) 为溶剂 A (甲醇) 45%/溶剂 B (水) 55%, 流动相流速 150 $\mu\text{L/min}$, 紫外检测波长 280 nm, 进样体积 10 μL 。检测源电喷雾离子检测器 (ESI), 负电离模式。鞘气流速 1.5 arb, 喷射电压 4.50 kV, 碰撞电压 25 V, 毛细管温度 275.00 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管电压 18.00 V, 碰撞气体氮气。转化产物检测结果如图 1 所示。可见含有 25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 LB 液体培养基经过菌株 EM28-2P⁻ 转化后, 代谢产物中残留大量氯霉素 (平均相对分子质量 323.13, 记为 M), m/z 321.0 及 323.0 为 $[M-H]^{-}$, 对应于氯霉素的两种同位素氯原子 (³⁵Cl 和 ³⁷Cl)。新生成 3 个离子峰 m/z 400.9, 402.8, 404.9 为 $[M+PO_3-H]^{-}$, 与最近在氯霉素生产菌 *S. venezuelae* 中发现的磷酸化氯

霉素质谱图很相似^[3], 对应于氯霉素 C3 位羟基的磷酸化产物。证明海洋病原菌 *Enterobacter* sp. EM28-2P⁻ 中存在氯霉素磷酸化灭活机制。已知有抗菌活性的氯霉素被转化成为没有抗菌活性的磷酸化氯霉素, 是由磷酸转移酶催化的^[3,4], 目前我们正在进行该酶的分离纯化鉴定研究。

参考文献:

- [1] EHRLICH J Q, BARTZ Q R, SMITH R M, et al. Chloromycetin a new antibiotic from a soil actinomycete[J]. Science, 1947, 106:417.
- [2] STEFAN S, CORINNA K, BENOIT D, et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28: 519-542.
- [3] MOSHER R H, CAMP D J, YANG K, et al. Inactivation of chloramphenicol by O-phosphorylation: a novel resistance mechanism in *Streptomyces venezuelae* ISP5230, a chloramphenicol producer [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270 (45): 27000-27006.
- [4] IZARD T, ELLIS J. The crystal structures of chloramphenicol phosphotransferase reveal a novel inactivation mechanism[J]. The EMBO Journal, 2000, 19: 2690-2700.
- [5] 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2000.

Inactivation of Chloramphenicol by O-phosphorylation by Marine Pathogenic Bacterium *Enterobacter* sp. EM28-2P⁻

MENG Fan-mei, WANG Kai, LIU Yu-huan, AI Yun-can

(State Key Lab for Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A case of inactivation of chloramphenicol by O-phosphorylation in a chloramphenicol-non-producer is reported, marine pathogenic *Enterobacter* sp. EM28-2P⁻ (Cm^r, cat⁻, MIC = 25 $\mu\text{g/mL}$). After having incubated with LB medium containing 25 $\mu\text{g/mL}$ authentic D-(-)-chloramphenicol for 24 hours, three significant fingerprint peaks at m/z 400.9, 402.8 and 404.9 for $[M+PO_3-H]^{-}$ corresponding to 3'-O-phosphor-chloramphenicol were detected out by liquid chromatography-mass spectrometry.

Key words: marine bacteria; chloramphenicol; resistance; phosphorylation; LC-MS analysis