

铜绿假单胞菌多重耐药基因的筛选及鉴定

赵兴艳, 梁海华, 沈立新, 董兆麟, 段康民*

(西北大学生命科学学院西部资源及现代生物技术教育部重点实验室, 西安 710069)

摘要:【目的】研究铜绿假单胞菌中与耐药性相关的基因。【方法】筛选转座突变文库中对多种抗菌药物敏感的突变体, 通过随机 PCR、核苷酸测序及序列比对确定突变体中转座子的插入位点及其破坏的基因。【结果】筛选得到 2 株对多种抗菌药物敏感的突变体, 其中被破坏的基因分别为功能未知的新基因 PA2580 和 PA2800。【结论】PA2580 和 PA2800 可能分别通过参与细胞氧化还原作用和细胞壁合成进而与铜绿假单胞菌耐药性相关。

关键词: 铜绿假单胞菌; 转座突变; 多重耐药性

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-1019-06

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 是一种条件致病菌, 在机体免疫力低下的情况下易发生感染, 已成为医院内感染最常见的病原菌之一, 临床治疗困难很大^[1,2]。

随着抗菌药物的广泛使用, 病原菌的耐药性日趋严重。目前认为病原菌主要存在以下 5 种耐药机制: ①细菌可以产生抗生素水解酶或钝化酶使之失活; ②改变抗生素作用的靶位使其失去作用位点; ③降低细胞膜的通透性使抗生素无法进入细胞不能到达作用靶位; ④通过主动外排机制将进入胞内的药物泵至胞外; ⑤生物被膜的形成^[3,4]。铜绿假单胞菌感染难以根除的主要原因是其具有内在的多重耐药性^[4~5], 机制较为复杂。寻找耐药基因、研究和揭示可能存在的耐药机制及分子机理是应对耐药性病原菌威胁的重要课题。

本试验利用转座子随机突变, 造成插入基因的失活, 通过高通量筛选获得对多种抗菌药物敏感的突变体; 经随机 PCR、核苷酸测序、序列比对后确定转座子插入位点, 发现了与多重耐药性相关的新基因, 对于深入了解细菌多重耐药性的分子机制、寻找药物作用的新靶点具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种: 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) SM10- λ pir (含质粒 pBT20^[6]) 均为本实验室保存。

1.1.2 培养基: LB 液体培养基: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L NaCl; LB 固体培养基: LB 液体培养基中加入 1.5% 的琼脂粉。假单胞分离琼脂培养基: 44.4 g/L 假单胞分离琼脂, 20 mL/L 甘油。根据试验需要添加相应的抗菌药物。

1.1.3 主要试剂和仪器: 酵母粉、胰蛋白胨为 OXOID 公司产品, 羧苄青霉素 (Carbenicillin)、四环素 (Tetracycline)、庆大霉素 (Gentamicin)、氯霉素 (Chloramphenicol)、环丙沙星 (Ciprofloxacin)、红霉素 (Erythromycin)、磺胺 (Sulfanilamide)、琼脂粉均来自 Wolsen 公司; 多粘菌素 (Polymixin) 来自 SIGMA 公司; DMSO、EDTA、Tris-base、CTAB、M9 培养基均为 Amresco 公司产品; Taq 酶、dNTP 均购自北京天为时代公司; DNA 产物纯化试剂盒购自鼎国公司; 假单胞分离琼脂 (PIA) 购自北京陆

基金项目: 国家自然科学基金(30470098); 重大基础研究前期研究专项(2004CCA01700)

*通讯作者: Tel: +86-29-88302132; E-mail: kduan@nwu.edu.cn

作者简介: 赵兴艳(1982-), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 研究方向为分子微生物学。E-mail: zxyt0801@163.com

收稿日期: 2008-02-14; 修回日期: 2008-05-08

桥技术有限责任公司；其他试剂均为国产分析纯。Wallac 1420 Multilabel counter 购自 PerKinElmer 公司；离心机 Centrifuge5415D、Centrifuge5810R、PCR 仪 Mastercycle gradient 均购自 Eppendorf 公司；Luminescent image analyzer LAS 3000 购自 Fujifilm 公司；96 孔板、384 孔板均为 Costar 公司产品；Multi-blot replicator (48 pins and 96 pins) 为 V&P 公司产品。

1.2 铜绿假单胞菌转座突变体文库的构建

采用双亲株杂交的方法进行转座突变^[6,7]。将含有转座子携带质粒 pBT20 的供体菌 *E.coli* SM10- γ pir 和受体菌 PAO1 分别接种在含庆大霉素 (50 μ g/mL) 和不含抗生素的 LB 平板上，过夜培养。将培养物分别悬浮在 LB 液体培养基中，4500 r/min 离心 5 min，用 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液洗涤菌体，然后将菌体各自悬浮在 2 mL 的 LB 液体培养基中，使供体菌的浓度为 $OD_{600}=40$ ，受体菌的浓度为 $OD_{600}=20$ 。将 25 μ L 供体菌悬浮液和受体菌悬浮液混合后点在 LB 平板上，同时分别取 50 μ L 供菌体和受体菌作为对照，37 $^{\circ}$ C 培养 2 h。将培养后的混合物刮下并悬浮在 M9 培养基中，然后取 100 μ L 涂布在含庆大霉素 (150 μ g/mL) 的假单胞分离琼脂平板上，37 $^{\circ}$ C 过夜培养，同时以供体菌和受体菌作为阴性对照。将选择培养基上长出的单克隆收集于 384 孔板中，培养 16 h 后加入 DMSO (终浓度为 10%) 于 -70 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 各种抗菌药物对铜绿假单胞菌最小抑制浓度(MIC)的测定

1.3.1 LB 固体培养基中铜绿假单胞菌 MIC 的测定：用 Multi-blot replicator 将 LB 液体培养基中过夜培养的野生型 PAO1 接种于含 1/2 浓度梯度稀释后的各种抗菌药物的 LB 平板上，37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后观察，确定 MIC 的大概范围^[8]，然后逐步缩小浓度范围最终确定每种抗菌药物的 MIC 精确浓度。

1.3.2 LB 液体培养基中铜绿假单胞菌 MIC 的测定：使用透明 96 孔板，以羧苄青霉素 500 μ g/mL、氯霉素 200 μ g/mL、环丙沙星 2 μ g/mL、红霉素 500 μ g/mL、四环素 100 μ g/mL、多粘菌素 20 μ g/mL、磺胺 2000 μ g/mL 为起始浓度进行 1/2 梯度稀释，每孔各 100 μ L 培养基，用 Multi-blot replicator 将处于指数生长期的野生型 PAO1 接种于培养基中，起始 OD_{600} 为 0.06~0.07，在 Wallac 1420 Victor multilabel counter 上于 37 $^{\circ}$ C 每隔半小时测定 OD_{600} ，共测定 24 h，根据生长曲线确定该抗菌药物对 PAO1 的 MIC。

1.4 抗菌药物敏感突变体的筛选

1.4.1 固体培养基中敏感突变体的初步筛选：从构建的转座突变体文库中筛选对 7 种抗菌药物，即羧苄青霉素、氯霉素、环丙沙星、红霉素、四环素、多粘菌素、磺胺敏感的菌株。首先将保存的转座突变体转接到含 LB 液体培养基的 384 孔板中，37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后，使用 Multi-blot replicator 将其点接到含 1/4MIC (固体) 抗菌药物的 LB 固体平板上，每块平板可点接 192 株突变体。培养 24 h 后进行观察，筛选出在含 1/4MIC 抗菌药物平板上不能生长或生长明显弱于野生 PAO1 的敏感突变体。将筛选得到的突变菌株在含抗菌药物的 LB 固体培养基上重新筛选 2 次以排除假阳性，并保存到 96 孔板中。

1.4.2 液体培养基中敏感突变体的复筛及其 MIC 的确定：将固体培养基中筛选得到的敏感突变体分别接种到加有 100 μ L LB 液体培养基的 96 孔板中，37 $^{\circ}$ C 过夜培养后，各取 3 μ L 转接到新鲜 LB 培养基中继续培养 3 h，然后使用 Multi-blot replicator 将突变体接种到 96 孔板中，板中预先添加了含有低于 PAO1 MIC (液体) 的抗菌药物的 LB 培养基，于 Wallac 1420 Victor multilabel counter 上检测接种量，控制起始 OD_{600} 为 0.06~0.07，在 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 24 h 后，再次检测其生长量，以 OD_{600} 浓度之差 0.02 作为抑制细菌生长的标准，确定各种抗菌药物对铜绿假单胞菌突变菌株的 MIC。

1.5 随机 PCR 及测序

通过随机 PCR 确定转座子的插入位点^[9]。随机 PCR 包括两次 PCR 反应，首先提取抗菌药物敏感突变体的基因组 DNA 作为模板，以 P7-1 : CTAACA-ATTGTTCAAGCCG 和 ARB1 : GGCCACGCGTCG-ACTAGTACNNNNNNNNNGATAT 为引物进行第一次 PCR，反应程序为：95 $^{\circ}$ C 5 min；95 $^{\circ}$ C 30 s，30 s，72 $^{\circ}$ C 1.5 min，重复 6 个循环；95 $^{\circ}$ C 30 s，45 s，72 $^{\circ}$ C 2 min，重复 30 个循环；72 $^{\circ}$ C 4 min。然后以第一次 PCR 产物作为模板，以 P7-2 : GGATGCGTCTAAAAGCCTGC 和 ARB2 : GGCCAC-GCGTCGACTAGTAC 为引物进行第二次 PCR，反应程序为：95 $^{\circ}$ C 1 min；95 $^{\circ}$ C 30 s，52 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 2 min，30 个循环；72 $^{\circ}$ C 4 min。P7-1、P7-2 都是以转座子上一段序列设计的引物，P7-2 位于 P7-1 下游，ARB1 为包含 ARB2 序列的随机引物 (图 1)。纯化后的 PCR 终产物以 P7-2 为引物进行测序，引物合成及测序委托北京博尚生物技术有限公司完成。

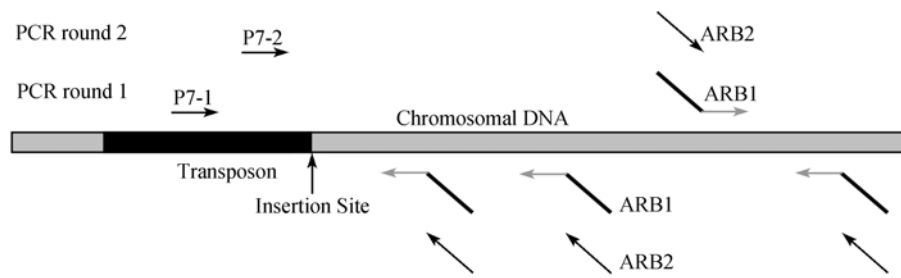


图 1 随机 PCR 原理图示

Fig. 1 Schematic depiction of primer binding in the two round arbitrary PCR.

2 结果

2.1 转座突变体文库的构建

为了寻找铜绿假单胞菌中与耐药性相关的基因,本研究利用转座子对铜绿假单胞菌基因组进行随机突变,构成转座突变体文库,用以筛选对多种抗菌药物敏感的突变体。随机突变利用携带 Mariner C9 转座酶和庆大霉素抗性基因的自杀质粒 pBT20 进行,通过双亲株杂交,在含庆大霉素(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的假单胞分离琼脂平板上长出的单克隆即为插入转座子的铜绿假单胞菌突变体。阴性对照无菌落生长。共挑取 17600 多个转座突变体保存于 46 块 384 孔板中构成转座突变体文库。

2.2 抗菌药物的选择及其对铜绿假单胞菌的最小抑制浓度

本试验选择具有不同的作用机理的 7 种抗菌药物进行筛选:羧苄青霉素为细胞壁合成抑制药物,多粘菌素能够破坏细胞膜的完整性,环丙沙星抑制 DNA 的合成和复制,氯霉素、红霉素、四环素为蛋白合成抑制药物,磺胺可以抑制叶酸的合成。试验确定了 7 种抗菌药物对野生型铜绿假单胞菌的最小抑制浓度(见表 1)。

表 1 各种抗菌药物对铜绿假单胞菌的最小抑制浓度
Table 1 MIC of antibacterial agents against PAO1

| Antibacterial agents | MIC on agar LB($\mu\text{g}/\text{mL}$) | MIC in liquid LB($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|----------------------|---|---|
| Carbenicillin | 250 | 225 |
| Chloramphenicol | 100 | 60 |
| Ciprofloxacin | 1.2 | 0.6 |
| Erythromycin | 360 | 300 |
| Tetracycline | 60 | 35 |
| Polymixin | 16 | 6 |
| Sulfanilamide | 1000 | 1000 |

2.3 抗菌药物多重敏感突变体的筛选

在固体 LB 平板上分别采用 7 种抗菌药物的 1/4MIC 浓度对转座突变体文库进行筛选,得到 192 株对抗菌药物敏感的转座突变菌株。将这些菌株转接至 LB 液体培养基中,在抗菌药物浓度低于野生菌株 MIC(液体)的条件下进一步筛选。在接种量相同的情况下,按照 1.4.2 的方法确定了各突变菌株对 7 种抗菌药物的 MIC,得到 32 株对抗菌药物敏感的突变体。对其中 2 株对多种抗菌药物敏感的突变体 S1 和 S2 进行了进一步研究,其 MIC 比野生型 PAO1 有明显降低,见表 2。其中,突变菌株 S1 对羧苄青霉素、氯霉素、环丙沙星三种抗菌药物敏感,其 MIC 分别为野生型 PAO1 的 1/3、1/2、1/2;突变菌株 S2 对环丙沙星和四环素敏感,其 MIC 分别为野生型 PAO1 的 1/2 和 1/3。

2.4 突变体中转座子插入位点的核苷酸序列分析

对筛选得到的对多种抗菌药物敏感的突变体 S1 和 S2 进行随机 PCR,以确定转座子在染色体上插入的具体位置以及被破坏的基因。引物 ARB1 包含 10 个随机寡核苷酸,可与染色体 DNA 随机进行结合,P7-1 与转座子特异性结合。第一次 PCR 可以扩增出大小不同的半随机 PCR 片段,其中既包含一个或多个以 P7-1 和 ARB1 为引物合成的包含部分转座子序列的、长度不同的目的片段,还可能包含以一对 ARB1 为引物合成的非目的片段(见图 2-A)。第二次 PCR 以 P7-2 和 ARB2 为引物,扩增出大小不同的目的片段和以一对 ARB2 为引物合成的非目的片段(见图 2-B)。以 P7-2 为引物对 PCR 终产物进行测序,P7-2 只能结合包含转座子序列的目的片段,得到其 DNA 序列。只有当转座子插入染色体单一一位点时,才能得到准确 DNA 测序,转座子多个位点插入将使 DNA 测序结果将出现双峰或多峰。S1 和 S2 测序均为单峰结果,表明是单一一位点突变体。

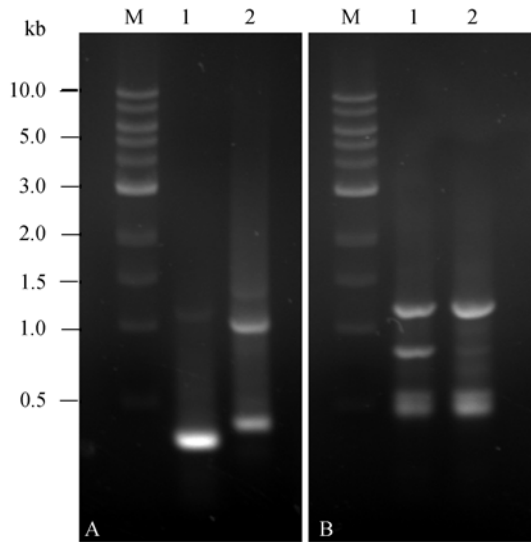


图 2 突变体随机 PCR 凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis graph of the arbitrary PCR products. A: Result of PCR round 1; B: Result of PCR round 2. M. DNA marker; 1. mutant strain S1; 2. mutant strain S2.

测序得到的 DNA 序列用 BLAST 软件与铜绿假单胞菌的基因组数据库 (www.pseudomonas.com) 或 GenBank 数据库进行比对,即可确定转座子的插入所破坏的基因。所测序列与 *P. aeruginosa* 标准株 PAO1 基因组中单一基因的一致性 (identities) 达 100% , 表明两个突变体中,转座子分别插入到铜绿假单胞菌染色体的这一基因中。

结果表明,在突变体 S1 和 S2 中转座子分别插入到 PA2580 和 PA2800 两个基因内部。PA2580 和 PA2800 均属于功能未知的 IV 类基因 (class 4), PA2580 编码的蛋白可能为 NADPH-醌还原酶 (NADPH-quinone reductase), PA2800 的产物可能属于脂蛋白 (表 2)。ClustalW2 比对结果显示, PA2580 所编码的蛋白与 *Escherichia coli* 的 MdaB 蛋白具有 75% 的同源性, PA2800 基因所编码的蛋白与 *Shigella flexneri* 的 VacJ 蛋白具有 52% 的相似性, 见图 3。

表 2 转座子插入位点及敏感突变体对药物的敏感程度

Table 2 Transposon insertion sites and drug susceptibilities of mutant strains

| Strain | Insertion site | Gene | Alternate gene name | Protein name confidence | COG predictions | MIC/(µg/mL) | | | |
|--------|----------------|--------|---------------------|-------------------------|---|-------------|-----|-----|-----|
| | | | | | | Car | Chl | Cip | Tet |
| PAO1 | | | | | | 225 | 60 | 0.6 | 35 |
| S1 | 2916759 | PA2580 | mdaB | class 4 | MdaB, Putative NADPH-quinone reductase (modulator of drug activity B) | 75 | 30 | 0.3 | 35 |
| S2 | 3157039 | PA2800 | vacJ | class 4 | VacJ, Surface lipoprotein | 225 | 60 | 0.3 | 12 |

Car, Carbenicillin; Chl, Chloramphenicol; Cip, Ciprofloxacin; Tet, Tetracycline.

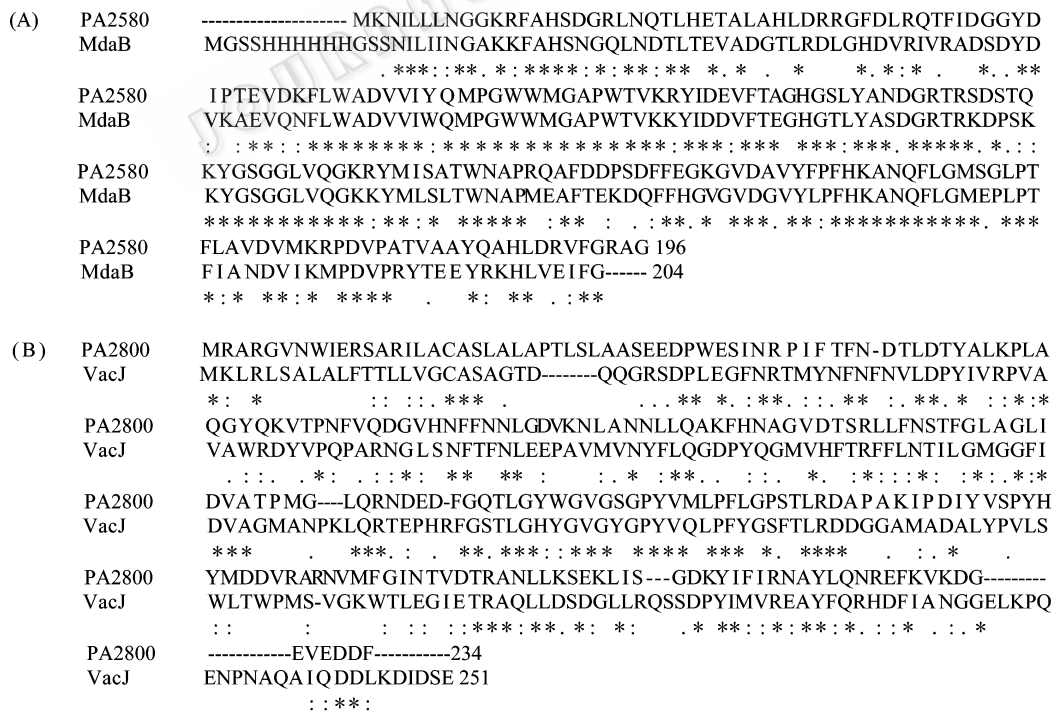


图 3 PA2580 及 PA2800 产物的比对结果

Fig. 3 ClustalW2 results of the products of PA2580 and PA2800. A: Result of the product of PA2580; B: Result of the product of PA2800. * means identical; : means conserved substitutions; . means semi-conserved substitutions.

3 讨论

铜绿假单胞菌全基因组测序的完成为研究其功能基因组提供了信息平台^[4],使全基因组水平寻找铜绿假单胞菌的耐药基因成为可能^[10],了解病原菌中耐药基因的常规方法是寻找已知耐药基因的同源基因,但这种方法无法得到新类别的耐药基因^[11]。本文应用转座突变技术研究细菌多重耐药性,试验使用7种作用机制不同的抗菌药物对铜绿假单胞菌的转座突变体文库进行筛选,找到了两个与铜绿假单胞菌多重耐药性相关的新基因。以 Multi-blot replicator 和 Multilabel counter 作为筛选工具,减少了工作量,具有高通量的优点。

本文从突变体文库中筛选得到两株与铜绿假单胞菌多重耐药性相关的基因 PA2580 和 PA2800 均为功能未知基因。PA2580 所编码的蛋白与 *Escherichia coli* 的 MdaB 蛋白具有 75% 的同源性。最早由于在 DMP 840、adriamycin 或 etoposide 等抗肿瘤药物存在时, *Escherichia coli* 可以通过过量表达 MdaB 蛋白而使自身受到保护,因而该蛋白被命名为毒性调节器 B (modulator of drug activity B)^[12]。而后又有实验证明此蛋白可使 *E. coli* 对聚乙烯类化合物产生抗性^[13],可能会改变拓扑异构酶的活性^[14]。Pfam 分析 PA2580 编码蛋白属于黄素氧化还原蛋白家族,推测其可能为 NADPH-醌还原酶。该酶为两个相同亚基的二聚体,以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)为辅基,将 NAD(P)H 的两个电子传递给醌类化合物进入呼吸链,使细胞免受自由基和活性氧簇破坏^[15]。目前对 PA2580 基因的研究未见任何报道,本试验证明该基因与铜绿假单胞菌多重耐药性有关,初步推断可能由于 PA2580 的破坏,使细菌处于高氧化状态,导致突变菌株 S1 对多种药物的抗性降低。

另一个突变株 S2 中,由于转座子插入到 PA2800 基因内部而对环丙沙星和四环素敏感。PA2800 基因所编码的蛋白与 *Shigella flexneri* 中的 VacJ 蛋白有 52% 的相似性, Pfam 显示 VacJ 可能属于脂蛋白类分子。Suzuki T、Murai T 等人的研究表明, VacJ 暴露于细菌表面,是 *Shigella flexneri* 在宿主细胞间传播蔓延所必需的^[16]。Atsushi Tabata 经实验发现 PA2800 所编码的蛋白属于外膜蛋白,该蛋白过量表达能够使 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 对季铵化合物产生抗性,而将该基因突变后菌体会对季铵化合物变

敏感,推断其可能为脂蛋白或通道蛋白,使药物不易进入菌体或将某些药物排出^[17]。本实验结果与 Atsushi Tabata 研究结果相吻合,突变株可能由于 PA2800 编码的脂蛋白或通道蛋白被破坏而对环丙沙星和四环素更为敏感。采用基因敲除,遗传互补等方法对这两个新基因的耐药机制进行的进一步研究尚在进行中。

参 考 文 献

- [1] Köhler T, van Delden C, Curty LK, *et al.* Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2001, 183(18): 5213-5222.
- [2] Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, *et al.* Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*, 1983, 5(2): 279-313.
- [3] 陈代杰. 抗菌药物与细菌耐药性. 上海: 华东理工大学出版社, 2001: 1-7.
- [4] Ochs MM, McCusker MP, Bains M, *et al.* Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(5): 1085-1090.
- [5] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000, 406(6799): 959-964.
- [6] Kulasekara HD, Ventre I, Kulasekara BR, *et al.* A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Mol Microbiol*, 2005, 55(2): 368-380.
- [7] Hidalgo AA, Trombert AN, Castro-Alonso JC, *et al.* Insertions of mini-Tn10 transposon T-POP in *Salmonella enterica* sv. typhi. *Genetics*, 2004, 167(3): 1069-1077.
- [8] Barlow M, Hall BG. Predicting evolutionary potential: in vitro evolution accurately reproduces natural evolution of the tem beta-lactamase. *Genetics*, 2002, 160(3): 823-832.
- [9] Das S, Noe JC, Paik S, *et al.* An improved arbitrary primed PCR method for rapid characterization of transposon insertion sites. *J Microbiol Methods*, 2005, 63(1): 89-94.
- [10] Croft L, Beatson SA, Whitchurch CB, *et al.* An interactive web-based *Pseudomonas aeruginosa* database: discovery of new genes, pathways and structures. *Microbiology*, 2000, 146(Pt10): 2351-2364.
- [11] Salipante SJ, Barlow M, Hall BG. GeneHunter, a transposon tool for identification and isolation of cryptic antibiotic resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(12): 3840-3845.
- [12] Adams MA, Iannuzzi P, Jia Z. MdaB from *Escherichia coli*: cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray

- analysis. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2005, 61(Pt 2): 235–238.
- [13] Adams MA, Jia Z. Modulator of drug activity B from *Escherichia coli*: crystal structure of a prokaryotic homologue of DT-diaphorase. *J Mol Biol*, 2006, 359(2): 455–465.
- [14] Chatterjee PK, Sternberg NL. A general genetic approach in *Escherichia coli* for determining the mechanism(s) of action of tumoricidal agents: application to DMP 840, a tumoricidal agent. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(19): 8950–8954.
- [15] Li R, Bianchet MA, Talalay P, *et al.* The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(19): 8846–8850.
- [16] Suzuki T, Murai T, Fukuda I, *et al.* Identification and characterization of a chromosomal virulence gene, *vacJ*, required for intercellular spreading of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*, 1994, 11(1): 31–41.
- [17] Tabata A, Nagamune H, Maeda T, *et al.* Correlation between resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quaternary ammonium compounds and expression of outer membrane protein OprR. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(7): 2093–2099.

Screen and identification of genes involved in multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

Xingyan Zhao, Haihua Liang, Lixin Shen, Zhaolin Dong, Kangmin Duan*

(Molecular Microbiology Laboratory, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: [Objective] To identify genes involved in multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. [Methods] We constructed and screened a transposon mutation library and obtained mutants that exhibited decreased drug resistance. The insertion sites of the transposon were identified by arbitrary PCR and subsequent DNA sequencing. [Results] Two mutants which became more susceptible to several antibacterial agents than the wild type were identified as mutants with transposon insertion in gene PA2580 and PA2800 respectively. The functions of these two genes are described as unknown in *P. aeruginosa* database. [Conclusion] PA2580 and PA2800 are involved in drug resistance, possibly through their roles in redox reactions and cell envelope biogenesis.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; transposon mutation; multidrug resistance

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470098) and the Major State Basic Research Program Preliminary Project (2004CCA01700)

*Corresponding author. Tel: +86-29-88302132; E-mail: kduan@nwu.edu.cn

Received: 14 February 2008/ Revised: 8 May 2008

《微生物学报》投稿方式

2007年12月修定

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面试行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

(1) 远程投稿:请先登录本刊网站 <http://journals.im.ac.cn>,进入《微生物学报》,点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先点击进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。

(2) 邮寄纸样:所有来稿均需要邮寄1份纸稿、介绍信。

(3) 稿件受理费:投稿时请随寄100元受理费,务必通过邮局汇款,切忌随信邮寄!

注:务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号”。