

重组细菌多药外排泵 AcrAB-TolC 的转运功能和动态组装

蒋嘉峰, 肖澜, 谢浩*, 沈雷, 陈自忍

武汉理工大学化学化工与生命科学学院, 湖北 武汉 430070

蒋嘉峰, 肖澜, 谢浩, 沈雷, 陈自忍. 重组细菌多药外排泵 AcrAB-TolC 的转运功能和动态组装[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4617-4628

Jiang Jiafeng, Xiao Lan, Xie Hao, Shen Lei, Chen Ziren. Transport function and dynamic assembly of a recombinant bacterial multidrug efflux pump, AcrAB-TolC[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4617-4628

摘要:【背景】多药外排泵多以膜蛋白复合体形式存在, 是导致细菌耐药性的重要原因。外排泵的转运功能和组装过程对于细菌耐药性和药物研发具有重要意义。【目的】以多药外排泵耐药结节细胞分化家族(resistance-nodulation-division family, RND)的重要成员 AcrAB-TolC 复合体为对象, 研究其转运活性和体外组装特性。【方法】基于大肠杆菌 AcrAB-TolC 复合体基因序列, 分别构建含有 *acrA*、*acrB*、*tolC* 基因的重组质粒, 表达和纯化复合体各亚基, 利用荧光光谱、等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)等技术分析复合体及亚基的转运功能、亚基与底物的相互作用, 以及亚基间的相互作用和动态装配。【结果】实现了 AcrAB-TolC 复合体各组分的表达和纯化(纯度>98%), 证实表达有各组分的活细胞提高了对于溴化乙锭(ethidium bromide, EB)的转运活性, 并发现群体感应效应信号分子 N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL)能够抑制 AcrB、TolC 对于 EB 的转运活性。ITC 结果进一步证实了 C6-HSL 与 AcrB、TolC 的相互作用。ITC 结果还显示 AcrA 分别与 AcrB、TolC 之间存在明显的相互作用, 而 AcrB 与 TolC 之间无明显的相互作用。在体外装配实验中观测到 AcrAB-TolC 亚基的单分子荧光强度随时间增加, 证实了复合体亚基在膜上的动态组装过程。【结论】实现了 AcrAB-TolC 外排泵及亚基的表达和纯化, 证实了 AcrAB-TolC 对底物的转运活性及与底物的相互作用, 观察到 AcrAB-TolC 的动态组装过程。以上结果为研究多药外排泵导致的细菌耐药性及抗菌策略具有重要意义。

关键词: 细菌耐药性; 耐药结节细胞分化家族; AcrAB-TolC; C6-HSL; 等温滴定量热法; 荧光; 动态组装

基金项目: 国家自然科学基金(31771032)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31771032)

*Corresponding author: E-mail: h.xie@whut.edu.cn

Received: 2022-02-10; Accepted: 2022-04-19; Published online: 2022-07-19

Transport function and dynamic assembly of a recombinant bacterial multidrug efflux pump, AcrAB-TolC

JIANG Jiafeng, XIAO Lan, XIE Hao*, SHEN Lei, CHEN Ziren

School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: [Background] Multidrug efflux pump mostly presents in the form of membrane protein complex, which makes major contributions to bacterial drug resistance. The transport function and assembly of the efflux pump are among the important issues for bacterial drug resistance and drug development. [Objective] Taking AcrAB-TolC, an important member of resistance-nodulation cell division (RND) family, as the research example, this study aimed to investigate and analyze the transport activity and *in vitro* assembly of the multidrug efflux pump complex. [Methods] Basing on the gene sequence of AcrAB-TolC complex in *Escherichia coli*, the recombinant plasmids containing *acrA*, *acrB* and *tolC* genes were constructed. Each subunit of the complex was expressed and purified. This study then explored the transport functions of the complex and subunits, the interaction between subunits and substrates, as well as the interaction between subunits and their dynamic assembly by means of fluorescence spectroscopy and isothermal titration calorimetry (ITC). [Results] The expression and purification of the subunits of the AcrAB-TolC complex have been achieved with the homogeneity to over 98%. It was confirmed that living cells with expressed individual subunits had increased activity to transport ethidium bromide (EB). The activities of AcrB and TolC to transport EB were affected by N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL), a quorum-sensing signal molecule. ITC results further confirmed the interactions between C6-HSL and AcrB or TolC. In addition, there were obvious correlations in AcrA-AcrB and AcrA-TolC, while no significant interaction was found in AcrB-TolC. In the *in vitro* assembly experiments, the monomolecular fluorescence intensity of AcrAB-TolC subunit increased with time, which validated the dynamic assembly of the complex subunits on the membrane. [Conclusion] The AcrAB-TolC efflux pump and its subunits were expressed and purified. The activity of AcrAB-TolC to transport and its interaction with substrates were verified. The dynamic assembly of AcrAB-TolC was observed. These results facilitated the study of bacterial drug resistance and antimicrobial strategies in associating with multidrug efflux pumps.

Keywords: bacterial resistance; resistance-nodulation-cell division family (RND); AcrAB-TolC; C6-HSL; isothermal titration calorimetry (ITC); fluorescence; dynamic assembly

抗菌药物是人类抵抗细菌感染的有力武器。然而,细菌可以通过多种方式获得对抗菌药物的抵抗能力而成为“耐药菌”,严重危害人类健康。2019年,全球约495万死亡案例与细菌耐药感染有关,其中127万人直接死于细菌耐药感染^[1]。2020年,中国细菌耐药监测网的

统计数据显示,临床上从患者体内分离出的菌株有71.9%为革兰氏阴性菌,对常用抗生素都存在较高的耐药水平^[2]。

细菌对于抗菌药物的耐药机制主要包括:(1)降解或修饰抗菌药物使其失活;(2)抑制抗菌药物的跨膜转运和吸收,或提高对抗菌药物

的外排能力,降低抗菌药物的胞内浓度;(3) 改变抗菌药物的作用靶点或受其影响的生理、代谢途径;(4) 形成细菌生物被膜阻碍和限制抗菌药物对细菌的作用^[3-5]。其中,细菌生物被膜是包裹着细菌群落的黏附聚合物,能够阻止抗生素等物质的扩散和进入细菌^[6-8]。细菌生物被膜的形成受细菌的群体感应(quorum sensing, QS)效应调控,通过达到阈值浓度的 QS 信号分子诱导特异基因的表达,促进生物被膜的形成^[9]。细菌多药外排泵多为膜蛋白复合体,不仅参与抗菌药物的转运^[10],也可能参与对革兰氏阴性菌的 QS 信号分子如酰基高丝氨酸内酯的转运^[11],在细菌的耐药性中有着极其复杂的功能。

耐药结节细胞分化家族(resistance-nodulation-cell division family, RND)是仅存在于革兰氏阴性菌中的多药外排泵家族,在临床所分离的耐药菌株中,常常存在上调表达的现象^[12-14]。AcrAB-TolC 多药外排泵家族是 RND 家族的主要代表,由内膜转运蛋白 AcrB、周质融合蛋白 AcrA 及外膜通道蛋白 TolC 组成,参与革兰氏阴性菌的药物外排、生物被膜形成的调控等多种生命活动,在细菌耐药性的形成中具有重要的作用^[15-16]。AcrAB-TolC 复合体呈现为不对称的哑铃棒结构,其三组分的化学计量比为 3:6:3^[17-18]。在组装过程中, AcrA 形成二聚体,与 AcrB 三聚体结合形成 AcrA-AcrB 复合物,再与 TolC 三聚体结合,组装成具有完整结构和功能的外排泵复合体^[19-21]。AcrAB-TolC 在行使转运功能时,底物从 AcrB 胞质侧开放处进入复合体,在 AcrB 跨膜区域网络中残基质子化导致的构象变化作用下进入中央腔室,经过由 TolC 和 AcrA 之间的收缩作用而打开的通道向胞外排放^[22-23]。

目前,对于外排泵复合体包括 RND 家族在内的研究,在功能性组装及转运底物的活性方

面仍然需要进一步深入^[24],以便于针对耐药菌提出新的抗菌策略和开发新的抗菌药物。因此,本研究将针对 AcrAB-TolC 的转运功能和功能组装进行研究,研究内容包括复合体及亚基的表达和纯化、转运功能测试及体外动态组装观察,以期多药外排泵相关的抗菌药物研发提供新的角度和思路。

1 材料与方法

1.1 菌株、引物及培养基

研究所用大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 K-12、DH5 α 、BL21(DE3)、质粒 pET-28a(+)均为本实验室保存。PCR 引物(表 1)由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0,氯化钠 10.0, pH 7.0, 1 \times 10⁵ Pa 灭菌 20 min。使用前添加经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌的卡那霉素至终浓度为 30 μ g/mL。

1.2 主要试剂和仪器

十二烷基- β -D-麦芽糖苷(N-dodecyl- β -D-maltoside, DDM), 麦克林试剂公司;细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)和 Ni-NTA 6FF 琼脂糖纯化树脂,生工生物工程(上海)股份有限公司;KOD-*plus*, TOYOBO

表 1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
AcrA_F <i>Nco</i> I	GATATACCATGGATGAACAAAAC
AcrA_R- <i>Xho</i> I	GTGGTGCTCGAGTTAAGACTTGGAC
AcrB_F- <i>Bam</i> H I	CGCGGATCCATGCCTAATTTCTTTATC G
AcrB_R- <i>Xho</i> I	CCGCTCGAGATGATGATCGACAGTAT GG
TolC_F- <i>Nco</i> I	CATGCCATGGGCATGAAGAAATTGCT CC
TolC_R- <i>Xho</i> I	CCGCTCGAGTTACGGAAAGGGTTA TGAC

公司; Alexa fluor 488 NHS Ester, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司; Alexa Fluor™ 532 C5 Maleimide 和 Fluorescent Dye Removal Columns, 南京赛泓瑞生物科技有限公司。

台式超速离心机, Beckman 公司; 荧光分光光度计, 上海棱光技术有限公司; 等温滴定量热仪, Malvern 公司; 全内反射荧光显微镜, Nikon 公司。

1.3 分子生物学实验

利用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取 *E. coli* K-12 总基因组 DNA, 使用高保真酶 (*KOD-plus*) 分别对 *acrA*、*acrB*、*tolC* 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): Genome DNA (50–100 ng/ μ L) 5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 5 μ L, 10 \times KOD plus buffer 5 μ L, MgSO₄ (25 mmol/L) 2 μ L, *KOD-plus* (1 U/ μ L) 1 μ L, Primer_F (10 μ mol/L) 1.5 μ L, Primer_R (10 μ mol/L) 1.5 μ L, ddH₂O 29 μ L。触减(touch down) PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 90 s/210 s, 10 个循环, 退火温度 -1 $^{\circ}$ C/循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 90 s/210 s, 10 个循环; 68 $^{\circ}$ C 10 min。随后经酶切、消化、连接后构建重组质粒载体 pET-28a[*AcrA*]、pET-28a[*AcrB*] 和 pET-28a[*TolC*], 转入 *E. coli* DH5 α 感受态用以保存, 转入 *E. coli* BL21(DE3)用以表达, 并送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4 蛋白的表达与纯化

含重组质粒的表达宿主菌种在含卡那霉素 (30 μ g/mL) 的 LB 培养基平板划线, 37 $^{\circ}$ C 培养 12–16 h, 挑选克隆接种至 3–5 mL LB 液体培养基(含卡那霉素 30 μ g/mL)中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 12–16 h, 然后按 1:100 的体积比接种于 LB 液体培养基(含卡那霉素 30 μ g/mL)中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 OD_{600} 值为 0.4–1.0 时添加 IPTG (终浓度 1.0 mmol/L), 于 16 $^{\circ}$ C 或

37 $^{\circ}$ C 继续培养 16 h, 诱导外排泵亚基蛋白的表达。诱导后的细菌于 4 $^{\circ}$ C、6 000 \times g 离心 10 min, 收集细菌沉淀于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

取 1 g 细菌沉淀重悬于 10 mL 缓冲液 A [20 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF), pH 8.0], 用细胞破碎机破碎, 4 $^{\circ}$ C、10 000 \times g 离心 20 min。含 *AcrA* 的破碎后离心上清液直接与 Ni-NTA 树脂在 4 $^{\circ}$ C 下混合结合 4 h, 经缓冲液 B (20 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L imidazole, pH 8.0)洗涤, 于洗脱液 C (20 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 500 mmol/L imidazole, pH 8.0)中洗脱。含 *AcrB* 或 *TolC* 的破碎后离心上清液于 4 $^{\circ}$ C、100 000 \times g 离心 25 min, 沉淀重悬于缓冲液 A 后添加 10% (质量体积分数) DDM 至终浓度为 1%, 4 $^{\circ}$ C 过夜溶解细胞膜后, 4 $^{\circ}$ C、100 000 \times g 离心 1 h; 取上清稀释 10 倍后与 Ni-NTA 树脂在 4 $^{\circ}$ C 下混合结合 4 h, 经含有 0.025% DDM 的缓冲液 B 洗涤多次, 于含有 0.025% DDM 的洗脱液 (20 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 500 mmol/L imidazole, 0.025% DDM, pH 8.0)中洗脱。获得的蛋白经超滤交换于含有 0.025% DDM 的 pH 7.4 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)用于后续实验。

1.5 溴化乙锭(ethidium bromide, EB)的活细胞转运实验

4 $^{\circ}$ C、6 000 \times g 离心 10 min 收集 *AcrA*、*AcrB*、*TolC* 亚基过表达的宿主菌, 用 KPI 缓冲液(100 mmol/L KH₂PO₄, 5 mmol/L MgSO₄, pH 7.0)洗涤 3 次, 重悬后调整至 OD_{600} 值为 1.0。取 900 μ L 菌液与 600 μ L 的 25 μ mol/L EB 混合, 测定混合液的荧光光谱, 制作细菌对 EB 的摄取曲线。摄取结束后, 取菌液于 8 000 \times g 室温离心 1 min, 弃上清, 重悬于 1.5 mL KPI, 以相

同条件测定荧光光谱, 制作细菌对 EB 的外排曲线。对照组 I 为不含质粒的 *E. coli* BL21(DE3); 对照组 II 为含有过表达非通道膜蛋白 INP-AidH 的细菌。EB 的摄取率或外排率 $= (X_t - X_0) / X_0 \times 100\%$, t 为 EB 的摄取或外排时间。相同检测条件下, 在测定前添加酰基高丝氨酸内酯分子 C6-HSL 至终浓度为 0.1 mmol/L, 以检测 C6-HSL 对外排泵亚基转运 EB 活性的影响。

1.6 等温滴定实验

等温滴定测量在 37 °C 进行。待滴定液体体积为 280 μ L, 完全除去气泡。滴定液体积为 38 μ L, 在 750 r/min 旋转中滴定 19 次, 滴定时间 4 s, 间隔反应 150 s。分别进行了 AcrA-AcrB、AcrA-TolC 和 AcrB-TolC 的相互作用检测以及高浓度 C6-HSL 和 AcrB、TolC 的相互作用检测。

1.7 AcrAB-TolC 外排泵的动态装配及观察

首先对 AcrB 蛋白进行荧光标记。AcrB 蛋白预先超滤透析于 10 mmol/L PBS 中, 浓度控制为 2–20 mg/mL, 再向每毫升蛋白溶液中加入 0.1 mL 的 1 mol/L 碳酸氢钠缓冲液调至 pH 8.3–9.0。向蛋白样品中添加 50–100 μ L/mL Alexa fluor 488 NHS Ester (10 mg/mL) 的染料, 室温下避光混匀搅拌孵育 2 h, 然后对 AcrA、TolC 进行荧光标记。AcrA 和 TolC 预先超滤透析于 10 mmol/L PBS 中, 浓度控制为 50–100 μ mol/L, 按荧光标记物:蛋白的摩尔比为(10–20):1 将二者混合, 室温避光混匀搅拌孵育 2 h。未结合荧光标记物采用 Fluorescent Dye Removal Columns 试剂盒去除。

AcrAB-TolC 外排泵的体外动态装配采用全内反射荧光显微镜(total internal reflection fluorescence microscope, TIRFM)测定。将荧光标记好的 AcrB、AcrA、TolC 依次滴定于预制二月桂酰基卵磷脂(1,2-dilauryl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC)膜上, 孵育 1 h 后进行拍摄, 取每个时间段分析 AcrAB-TolC 外排泵的动态

装配过程。屏幕的观测范围是 50 μ m \times 50 μ m。

2 结果与分析

2.1 AcrAB-TolC 复合体亚基功能性表达与纯化

利用含有重组质粒载体 pET-28a[AcrA]、pET-28a[AcrB] 和 pET-28a[TolC] 的大肠杆菌 BL21(DE3)为表达宿主, 利用 IPTG 分别进行了诱导表达, SDS-PAGE 电泳检测结果与预期一致, 即在 43 kDa (AcrA)、113 kDa (AcrB)、55 kDa (TolC)处观察到有蛋白质表达, 表明各亚基的诱导表达获得了成功(图 1A–1C), 并且 0.1–1 mmol/L 浓度范围内的 IPTG 对于 AcrAB-TolC 各亚基的表达量并无显著影响。此外, 利用 Ni-NTA 亲和层析技术对 AcrA、AcrB、TolC 的纯化也获得了成功(图 1D), 并且纯度大于 98%。

利用表达有 AcrAB-TolC 复合体各亚基的大肠杆菌 BL21(DE3)宿主菌, 进一步对 AcrAB-TolC 各亚基对于外排泵转运底物荧光染料 EB 的转运活性进行了研究。由于大肠杆菌基因组含有 AcrAB-TolC 复合体基因, 因此, 以不含表达质粒的 BL21(DE3)作为对照组 I, 以含有表达非通道蛋白 INP-AidH 质粒的 BL21(DE3)为对照组 II。结果(图 1E、1F)显示, BL21(DE3)表达了 AcrAB-TolC 复合体的重组亚基对 EB 的摄取率和外排率明显高于对照组, 但在 AcrA、AcrB 和 TolC 各亚基之间, AcrB 对 EB 的摄取率和外排率高于 AcrA 和 TolC, 不过差异并不显著。这表明基因组编码的内源 AcrAB-TolC 各亚基也参与了经诱导表达后各亚基的组装以及对 EB 的转运, 因此, 无论哪种亚基的表达都能通过参与 AcrAB-TolC 的组装提高其数量从而促进宿主对 EB 的摄取率和外排率。然而, AcrB 是内膜转运蛋白, AcrB 的表达对于 AcrAB-TolC 复合体的组装和数量提高的贡献更明显。对照

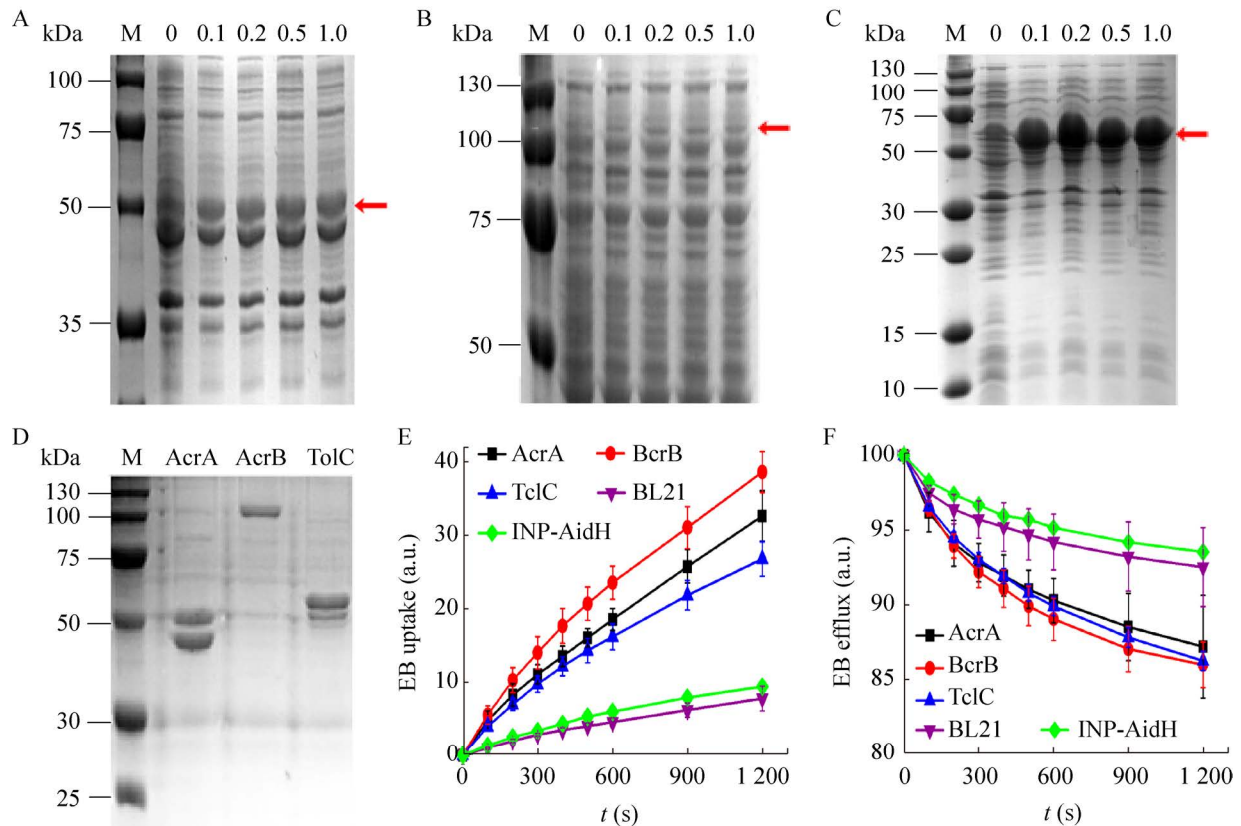


图 1 AcrA、AcrB、TolC 的诱导表达(A、B、C)、纯化(D)以及对 EB 的摄取(E)和外排(F) M: 分子量标记。A-C: 0、0.1、0.2、0.5、1.0 分别对应 IPTG 浓度为 0、0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L, 箭头指向各亚基对应的位置; D: AcrA、AcrB、TolC 分别对应纯化的复合体亚基; E: 重组外排泵亚基的表达对于 EB 摄取的影响; F: 重组外排泵亚基的表达对于 EB 外排的影响

Figure 1 Induced expression of AcrA, AcrB, TolC (A, B, C), purification (D) and EB uptake (E), efflux (F). A, B, C, M: Molecular weight marker, 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1: Total proteins of cells induced by IPTG at concentrations of 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mmol/L; D: Showed purified subunits of AcrAB-TolC complex; E, F: Showed EB uptake and efflux by cells with expressed subunit of AcrAB-TolC complex.

组 II 比对照组 I 的摄取率和外排率略有增加, 但也不显著, 这可能与 INP-AidH 的表达影响了外膜通透性或者外排泵组装有关。

通过以上研究获得了具有活性的 AcrAB-TolC 各亚基, 据此推测, 额外表达的 AcrAB-TolC 各亚基可以参与内源 AcrAB-TolC 复合体的组装, 并参与对 EB 的转运。

2.2 AcrAB-TolC 复合体各亚基与 C6-HSL 的相互作用

有研究报道, RND 家族在一定条件下参与

了革兰氏阴性菌 QS 信号分子酰基高丝氨酸内酯的转运^[25-26]。我们测试了酰基高丝氨酸内酯 C6-HSL 对表达有 AcrAB-TolC 复合体重组亚基的细菌转运 EB 活性的影响。EB 的摄取和外排数据显示, 对于未表达 AcrAB-TolC 复合体亚基的细菌而言, C6-HSL 对 EB 的摄取和外排无显著影响(图 2A、2B)。对于表达有重组 AcrA 亚基的细菌而言, C6-HSL 对于 EB 的摄取和外排也无显著影响(图 2C、2D)。对于表达有重组 AcrB 亚基、重组 TolC 亚基的细菌而言, C6-HSL

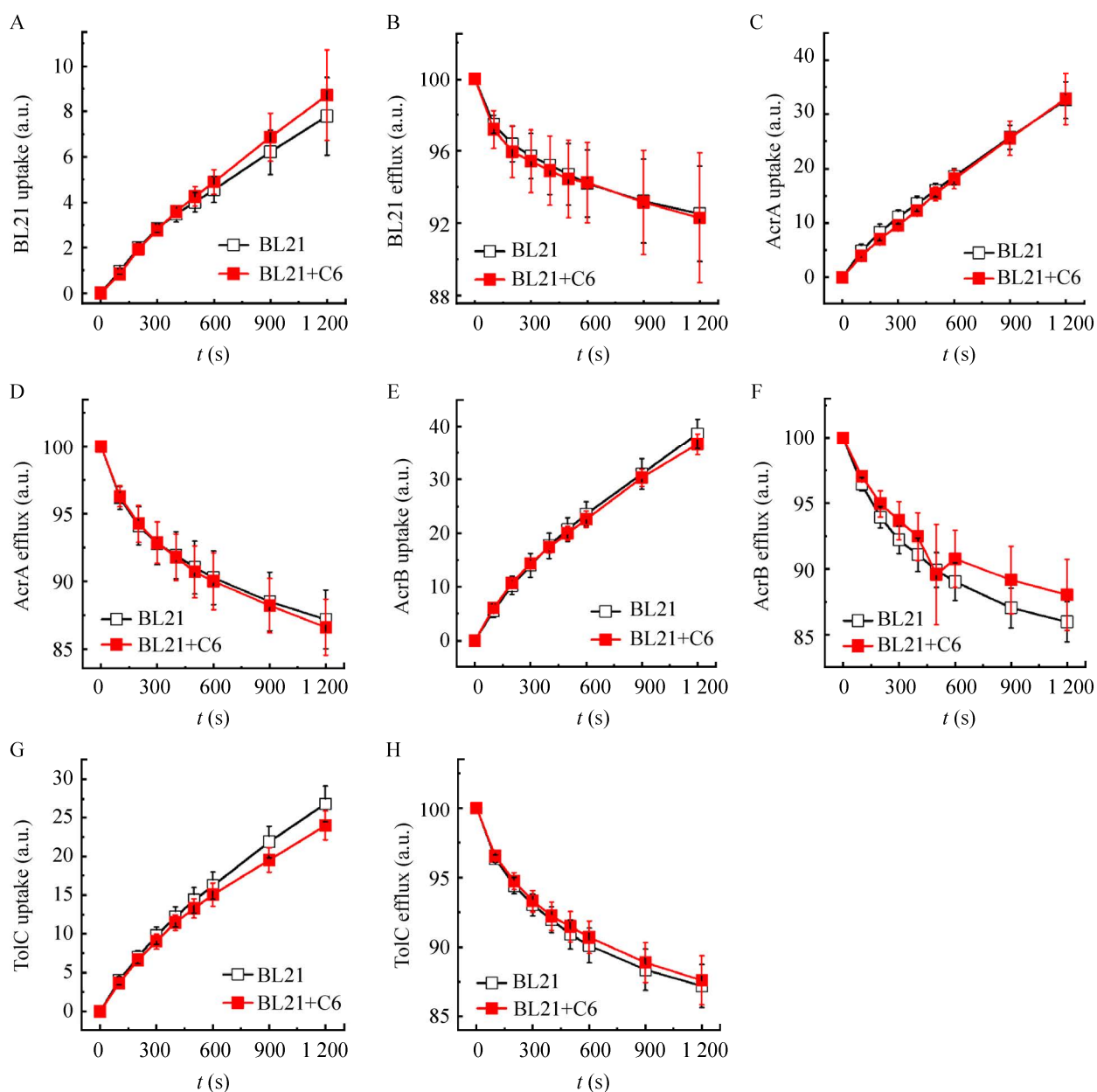


图 2 C6-HSL 对表达有 AcrAB-TolC 复合体亚基细菌 EB 转运活性的影响 A 和 B: C6-HSL 对于未额外表达 AcrAB-TolC 复合体亚基细菌的 EB 摄取和外排影响; C 和 D: C6-HSL 对于表达有 AcrA 亚基细菌的 EB 摄取和外排影响; E 和 F: C6-HSL 对于表达有 AcrB 亚基细菌的 EB 摄取和外排影响; G 和 H: C6-HSL 对于表达有 TolC 亚基细菌的 EB 摄取和外排影响

Figure 2 Effects of C6-HSL on EB transport activity of bacteria expressing AcrAB-TolC complex subunits. A, B: Showed the effect of C6-HSL on EB uptake and efflux of bacteria without additional expression of AcrAB-TolC complex subunits; C, D: Showed the effect of C6-HSL on EB uptake and efflux of bacteria expressing AcrA subunit; E, F: Showed the effect of C6-HSL on EB uptake and efflux of bacteria expressing AcrB subunit; G, H: Showed the effect of C6-HSL on EB uptake and efflux of bacteria expressing TolC subunit.

对 EB 的转运活性有抑制作用,表现为对 EB 的摄取率和外排率均略有降低。由于 AcrA 为周质蛋白,仅在 AcrAB-TolC 复合体组装中发挥功能,未直接与转运底物发生相互作用,所以 C6-HSL 对于 AcrAB-TolC 复合体介导的 EB 转运活性基本无影响;而 AcrB 和 TolC 分别为内膜和外膜通道蛋白,直接介入了 AcrAB-TolC 复合体对 EB 的转运,其表达量和 EB 的转运活性有关。当 C6-HSL 作为底物与 EB 竞争额外表达的 AcrB 和 TolC 亚基时,会减少额外参与 EB 转运的 AcrAB-TolC 复合体的 AcrB 和 TolC 亚基的组装,从而降低对 EB 的转运活性(图 2E-2H)。需要指出的是,由于重组 AcrB 亚基或重组 TolC

亚基的表达量未达到显著影响 EB 转运活性的水平,不能完全排除内源 AcrB 亚基或 TolC 亚基的影响,所以 C6-HSL 对 EB 转运活性的抑制效果不显著。

为了进一步证实 C6-HSL 与 AcrAB-TolC 复合体各亚基的相互作用,进一步利用等温滴定技术测试了纯化的 AcrB、TolC 与 C6-HSL 的相互作用。(图 3A-3D)结果表明, C6-HSL 与 AcrB 和 TolC 均表现出了较为明显的相互作用(作用位点 $N > 1$),而且与 AcrB 的结合更明显($N=5.12$)。综合以上结果和 C6-HSL 抑制 EB 转运活性的实验结果,表明 C6-HSL 确实与 AcrAB-TolC 复合体的内膜转运蛋白 AcrB 和外膜通道蛋白 TolC 有相互

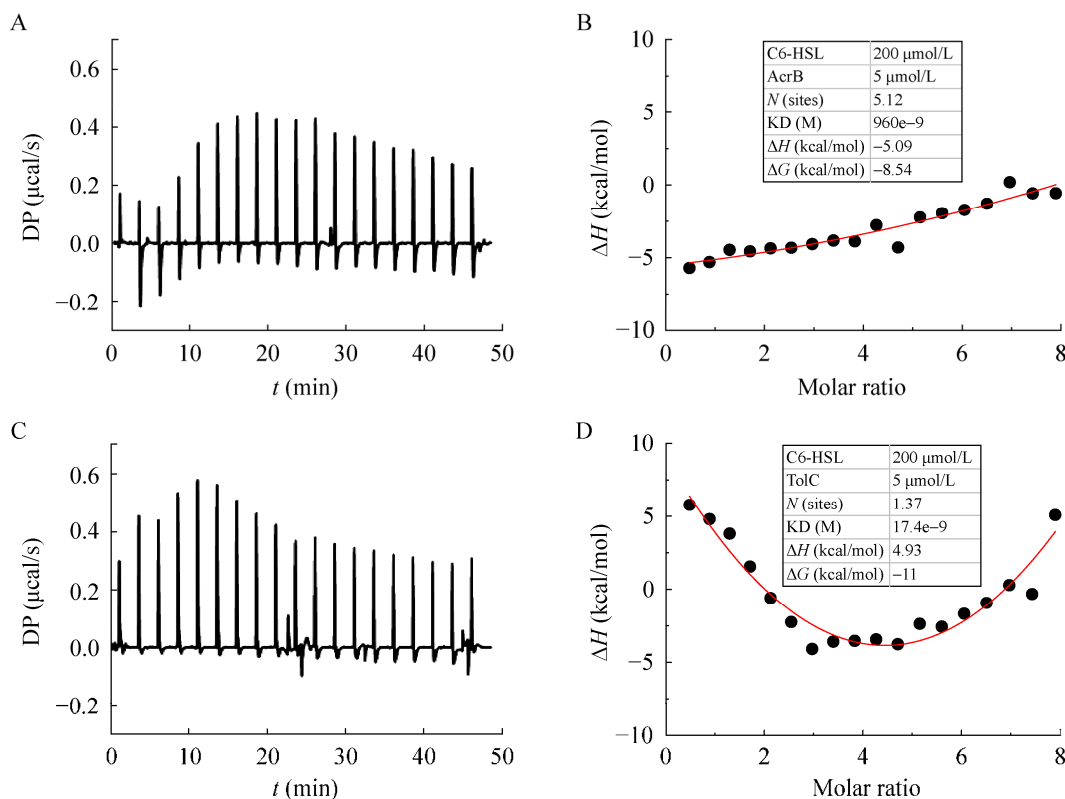


图 3 C6-HSL 与 AcrB、TolC 相互作用的等温滴定检测 A 和 B: C6-HSL 和 AcrB 相互作用的等温滴定曲线和热量变化, C 和 D: C6-HSL 和 TolC 相互作用的等温滴定曲线和热量变化

Figure 3 Isothermal titration detection of interaction between C6-HSL with AcrB and TolC. A, B: Showed the isothermal titration curve and heat change of the interaction between C6-HSL and AcrB. C, D: Showed the isothermal titration curve and heat change of the interaction between C6-HSL and TolC.

作用,而周质蛋白 AcrA 是通过参与复合体组装过程影响 AcrAB-TolC 复合体的转运活性。

2.3 AcrAB-TolC 的体外组装

根据文献 [27] 报道及前述实验结果,

AcrAB-TolC 复合体亚基间可能存在相互作用及动态组装过程。利用等温滴定技术测试了纯化的 AcrA、AcrB、TolC 亚基间的相互作用,发现 AcrA 和 AcrB 之间(图 4A、4B)及 AcrA 和

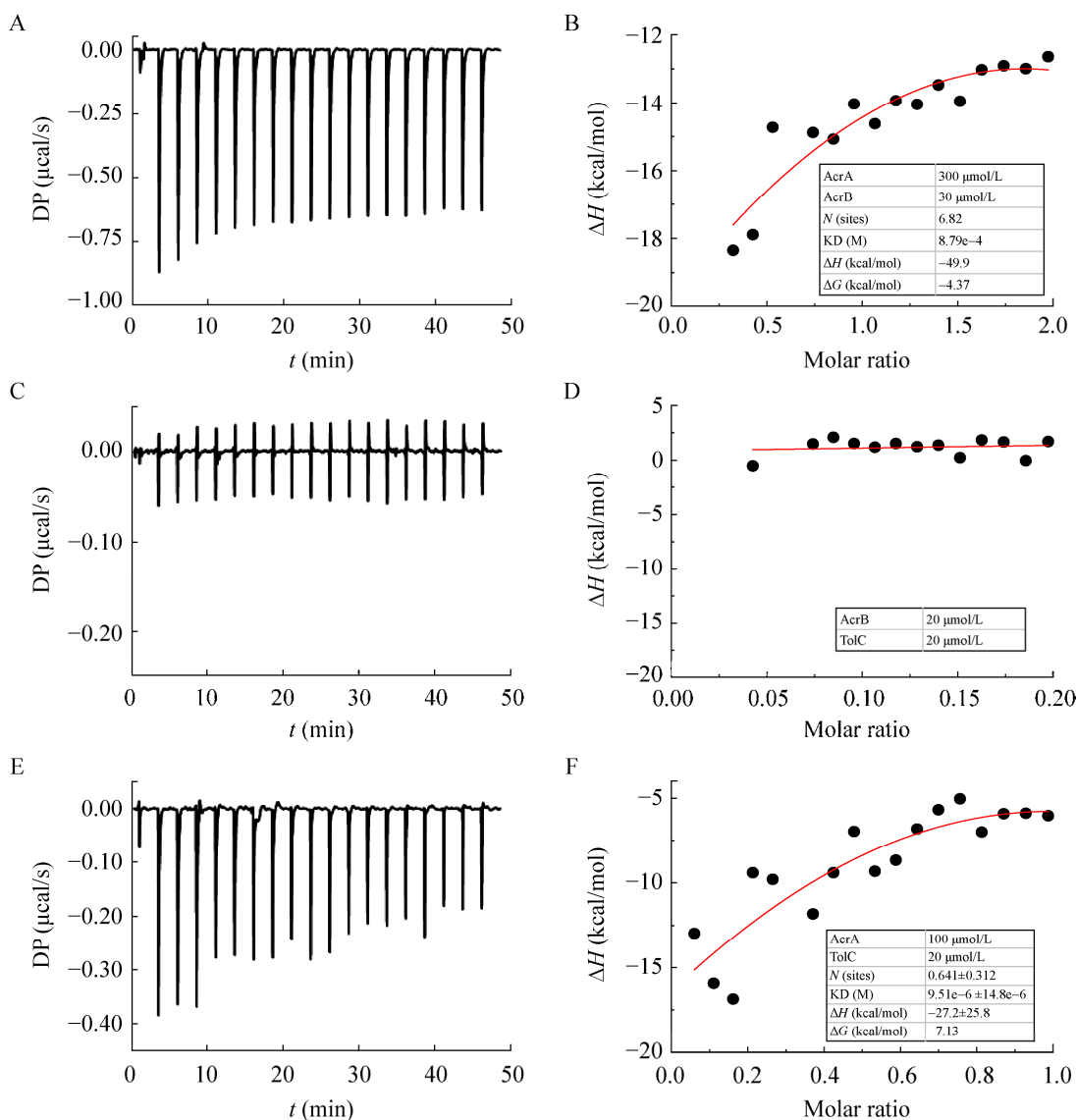


图 4 AcrAB-TolC 各亚基相互作用的等温滴定检测 A 和 B: AcrA 和 AcrB 相互作用的等温滴定曲线和热变化; C 和 D: AcrB 和 TolC 相互作用的等温滴定曲线和热变化; E 和 F 显示 AcrA 和 TolC 相互作用的等温滴定曲线和热变化

Figure 4 Isothermal titration detection of interaction between AcrAB-TolC each subunit. A, B: Showed the isothermal titration curve and heat change of the interaction between AcrA and AcrB. C, D: Showed the isothermal titration curve and heat change of the interaction between AcrB and TolC. E, F: Showed the isothermal titration curve and heat change of the interaction between AcrA and TolC.

TolC 之间(图 4E、4F)存在较为明显的相互作用,但是 AcrB 和 TolC 之间(图 4C、4D)无明显的相互作用。这个结果表明,周质蛋白 AcrA 在 AcrAB-TolC 复合体的组装过程中起到了联系两个亚基 AcrB 和 TolC 的作用。AcrA-AcrB 间的解离常数(K_D)远高于 AcrA-TolC 间的解离常数,表明 AcrA-AcrB 比 AcrA-TolC 具有更加稳定的相互作用。可能因为 AcrB 形成了三聚体,可以与多个 AcrA 亚基发生相互作用。当 AcrA 和 AcrB 形成较稳定的多聚体后,再与 TolC 相互作用形成具有完整功能的 AcrAB-TolC 复合体。

进一步利用单分子荧光技术对 AcrA、AcrB、TolC 在膜上的组装过程进行了观察。首先分别对 AcrA、AcrB、TolC 这 3 种蛋白进行了荧光标记,然后在 DLPC 膜上依次滴加 AcrB、AcrA、TolC 并进行孵育,采用全内反射荧光显微镜观测和拍摄。基于显微镜下所观察到的荧光点数量、亮度、尺寸、运动的变化情况,可以分析荧光标记的 AcrAB-TolC 复合体亚基的组装进程。实验结果显示,在 AcrAB-TolC 组装起始后 1 h 内,蛋白质组装体所体现的荧光点数量和亮度无明显变化(图 5A-5D)。但是从 1 h 后荧光强度增加,说明 3 种蛋白在 DLPC 膜上进一步

组装成比蛋白单体大的聚集体形态。

3 讨论与结论

AcrAB-TolC 外排泵复合体通过转运药物分子或转运 QS 信号分子导致生物被膜的形成,从而直接或间接地参与细菌的耐药作用,在耐药菌的药物研发中具有重要意义。目前,对于 AcrAB-TolC 外排泵复合体的结构和功能已经有了较多研究,但各亚基及在转运底物中的作用还有待深入了解,尤其对 AcrAB-TolC 各亚基的组装及 QS 信号分子的转运尚无直接证据。本研究中,我们对 AcrAB-TolC 外排泵复合体各亚基重组蛋白分别进行了表达并测试了对 EB 的转运活性,研究结果表明,各亚基参与了 AcrAB-TolC 外排泵复合体的组装并影响转运活性。通过测试酰基高丝氨酸内酯 C6-HSL 对于表达有 AcrAB-TolC 复合体重组亚基的细菌转运 EB 活性的影响,以及 C6-HSL 和纯化的 AcrAB-TolC 复合体各亚基的相互作用,结果显示,C6-HSL 与 AcrB 和 TolC 具有较明显的相互作用,并能抑制 EB 的转运活性。这些结果支持 C6-HSL 是 AcrAB-TolC 复合体的底物之一,并且 AcrAB-TolC 复合体各亚基是通过组装形

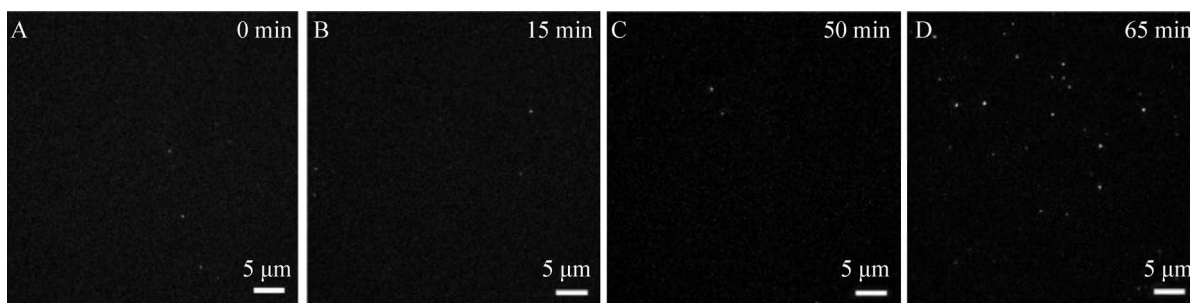


图 5 AcrAB-TolC 外排泵在 DLPC 膜上的动态装配过程 A-D: 分别显示的组装起始及 15、50、65 min 时荧光点强度和数量变化

Figure 5 The dynamic assembly process of AcrAB-TolC efflux pump on the DLPC membrane. A, B, C, D: Respectively showed the changes of fluorescence point intensity and number at the beginning of assembly, 15, 50 and 65 min.

成复合体后参与底物转运的结果。最后, 我们利用等温滴定实验观察到 AcrA-AcrB 间、AcrA-TolC 间的相互作用, 发现 AcrA 介导的 AcrB 和 TolC 组装成了具有功能的 AcrAB-TolC 复合体, 并提出利用单分子荧光技术观察 AcrAB-TolC 外排泵在脂膜上的动态装配过程, 对后续研究 AcrAB-TolC 外排泵动态装配的动力学数据提供了实验依据。随着国内外对细菌耐药性研究的深入, 未来的研究将重点关注多药排外泵的动态装配过程及调控的分子机制, 可为相关的药物研发提供理论和技术支持。

REFERENCES

- [1] Murray C J L, Ikuta K S, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. *The Lancet*, 2022, 399(10325): 629-655
- [2] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶等. 2020 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2021, 21(4): 377-387
Hu FP, Guo Y, Zhu DM, Wang F, Jiang XF, Xu YC, Zhang XJ, Zhang ZX, Ji P, Xie Y, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance: results of 2020[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2021, 21(4): 377-387 (in Chinese)
- [3] 崔海英, 张雪婧, 赵呈婷, 周慧, 李伟, 林琳. 细菌生物膜的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(8): 11-14
Cui HY, Zhang XJ, Zhao CT, Zhou H, Li W, Lin L. Research progress of bacterial biofilm[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2015, 43(8): 11-14 (in Chinese)
- [4] Van Duijkeren E, Schink AK, Roberts MC, Wang Y, Schwarz S. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents[J]. *Microbiology Spectrum*, 2018, 6(1): 2018 Jan;6(1)
- [5] Davin-Regli A, Pages JM, Ferrand A. Clinical status of efflux resistance mechanisms in Gram-negative bacteria[J]. *Antibiotics*: Basel, Switzerland, 2021, 10(9): 1117
- [6] Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8(9): 881-890
- [7] Høiby N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections[J]. *Pathogens and Disease*, 2014, 70(3): 205-211
- [8] Garcia A B, Percival S L. Zoonotic infections: the role of biofilms[A]. *Biofilms and Veterinary Medicine*[M]. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011: 69-110
- [9] Mukherjee S, Moustafa D, Smith CD, Goldberg JB, Bassler BL. The RhlR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer[J]. *Plos Pathogens*, 2017, 13(7): e1006504
- [10] Nishino K, Yamasaki S, Nakashima R, Zwama M, Hayashi-Nishino M. Function and inhibitory mechanisms of multidrug efflux pumps[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 737288
- [11] Wu SB, Liu JH, Liu CJ, Yang AD, Qiao JJ. Quorum sensing for population-level control of bacteria and potential therapeutic applications[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2020, 77(7): 1319-1343
- [12] Weston N, Sharma P, Ricci V, Piddock LJV. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in *Enterobacteriaceae*[J]. *Research in Microbiology*, 2018, 169(7/8): 425-431
- [13] Blair JMA, Smith HE, Ricci V, Lawler AJ, Thompson LJ, Piddock LJV. Expression of homologous RND efflux pump genes is dependent upon *AcrB* expression: implications for efflux and virulence inhibitor design[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70(2): 424-431
- [14] Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, 19(2): 382-402
- [15] Klenotic PA, Moseng MA, Morgan CE, Yu EW. Structural and functional diversity of resistance-nodulation-cell division transporters[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(9): 5378-5416
- [16] 华炜聪, 邓在春, 张筠, 朱丹萍, 陈众博. AcrAB-TolC 外排泵在多重耐药肠杆菌中的作用研究进展[J]. *中国现代医生*, 2021, 59(4): 184-188
Hua WC, Deng ZC, Zhang Y, Zhu DP, Chen ZB. Research progress of AcrAB-TolC efflux pump in multidrug resistant enterobacteria[J]. *China Modern Doctor*, 2021, 59(4): 184-188 (in Chinese)
- [17] Hayashi K, Nakashima R, Sakurai K, Kitagawa K, Yamasaki S, Nishino K, Yamaguchi A. AcrB-AcrA fusion proteins that act as multidrug efflux transporters[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 198(2): 332-342
- [18] Tikhonova EB, Yamada Y, Zgurskaya HI. Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC[J]. *Chemistry & Biology*, 2011, 18(4): 454-463

- [19] Monroe N, Sennhauser G, Seeger MA, Briand C, Grütter MG. Designed ankyrin repeat protein binders for the crystallization of AcrB: plasticity of the dominant interface[J]. *Journal of Structural Biology*, 2011, 174(2): 269-281
- [20] Lu W, Zhong M, Chai Q, Wang ZS, Yu LL, Wei YN. Functional relevance of AcrB trimerization in pump assembly and substrate binding[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89143
- [21] Wang ZS, Lu W, Rajapaksha P, Wilkop T, Cai YG, Wei YN. Comparison of *in vitro* and *in vivo* oligomeric states of a wild type and mutant trimeric inner membrane multidrug transporter[J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2018, 16: 122-129
- [22] Shi XD, Chen MY, Yu ZL, Bell JM, Wang H, Forrester I, Villarreal H, Jakana J, Du DJ, Luisi BF, et al. *In situ* structure and assembly of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2635
- [23] Wang Z, Fan GZ, Hryc CF, Blaza JN, Serysheva II, Schmid MF, Chiu W, Luisi BF, Du DJ. An allosteric transport mechanism for the AcrAB-TolC multidrug efflux pump[J]. *Elife*, 2017, 6: e24905
- [24] Yang S, Lopez CR, Zechiedrich EL. Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichia coli*[J]. *PNAS*, 2006, 103(7): 2386-2391
- [25] Papenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 576-588
- [26] Alav I, Kobylka J, Kuth MS, Pos KM, Picard M, Blair JMA, Bavro VN. Structure, assembly, and function of tripartite efflux and type 1 secretion systems in Gram-negative bacteria[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(9): 5479-5596
- [27] Touzé T, Eswaran J, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(2): 697-706