

研究报告



利用系统作图(Systems mapping)研究大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的互作遗传机制

张佐然 李金婷 梁雅静 张琦 金一 何晓青*

北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083

摘要:【背景】物种间相互作用是物种进化的重要推动力,然而如何将基因型和表型关联以及确定在物种相互作用过程中起重要作用的基因均面临挑战。【目的】通过系统作图(Systems mapping)得到两种微生物在相互作用过程中起重要作用的 SNPs (Single nucleotide polymorphism),以及随着时间的变化,这些 SNPs 是如何相互联系进而影响大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的相互作用。【方法】分别对 45 株大肠埃希菌、45 株金黄色葡萄球菌进行单独培养和混合共培养,通过实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qPCR)进行绝对定量,得到一定时间内各个菌株的生长量,比较相同菌株在不同培养条件下生长情况,以各个菌株重测序结果为基础,结合系统作图得到在相互作用过程中起重要作用的显著 SNPs 及其相互联系。【结果】通过系统作图分析,获得具有 54 对显著 SNPs 组合的三维曼哈顿图,这些组合中 41 个显著 SNPs 来自大肠埃希菌,12 个显著 SNPs 来自金黄色葡萄球菌。在上述 SNPs 中已有 6 个 SNPs 所在的候选基因都可以直接或者间接影响微生物的生长量变化,从而影响两种微生物相互作用方式。它们分别是 *nhaR* (E19056)参与生物膜的形成, *rhIE* (E832164)与核糖体的组装有关, *csiD* (E2789300)的表达可以使细胞面对恶劣环境, *alkB* (E2309274)可以参与 DNA 的损伤修复, *sucA* (E759230)和 *yjjW* (E4614704)都参与细胞的代谢过程。【结论】系统作图可以检测到物种在相互作用过程中显著 SNPs; 物种相互作用过程中不同 SNPs 遗传效应随着时间变化; 细菌的相互作用过程是直接遗传效应、间接遗传效应和上位性效应共同产生的结果。

关键词: 物种相互作用, 大肠埃希菌, 金黄色葡萄球菌, 单核苷酸多态性, 系统作图

Analysis of interaction mode between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by systems mapping

ZHANG Zuo-Ran LI Jin-Ting LIANG Ya-Jing ZHANG Qi JIN Yi HE Xiao-Qing*

College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] The interaction between species is an important driving force for the evolution of species. But it is challenging to determine the single nucleotide polymorphism (SNPs) that play an

Foundation items: Central Universities Fundamental Research Projects (2017JC05); National Natural Science Foundation of China (31700633, 51108029); Science and Technology Service Network Initiative (KFJ-STZ-ZDTP-036); Research Projects of MWR Industry Public Service Sectors (201201032)

*Corresponding author: E-mail: lenahe@bjfu.edu.cn

Received: 05-12-2018; Accepted: 14-01-2019; Published online: 17-01-2019

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(2017JC05); 国家自然科学基金青年科学基金(31700633, 51108029); 中科院科技服务网络计划(KFJ-STZ-ZDTP-036); 水利部行业公益性行业科研专项(201201032)

*通信作者: E-mail: lenahe@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2018-12-05; 接受日期: 2019-01-14; 网络首发日期: 2019-01-17

important role in the process of interaction between species and establish an accurate genotype-phenotype map. **[Objective]** To obtain the significant SNPs that play an important role in the interaction between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and to detect how do these SNPs relate to each other over time. **[Methods]** Real-time quantitative PCR (qPCR) was used to determine the abundance of all strains. We reared *E. coli* and *S. aureus* in monoculture and compared to the difference of growth between the same strain in monoculture and co-culture. The phenotypes and genotypes of all strains were analyzed by systems mapping and the significant SNPs were found out. **[Results]** We obtained a three-dimensional Manhattan plot that identifies 54 significant combinations of SNPs derived from 41 SNPs in *E. coli* and 12 SNPs in *S. aureus*. Among them, 6 genes we obtained by annotation can directly or indirectly affect the growth of microorganisms, *nhaR* (E19056) was involved in the formation of biofilm, *rhIE* (E832164) is related to ribosome assembly, the expression of *csiD* (E2789300) can make cells face stress environment, *alkB* (E2309274) can participate in DNA damage repair, *sucA* (E759230) and *yjjW* (E4614704) are involved in the metabolic process of cells. **[Conclusion]** Systems mapping can detect the significant SNPs. The genetic effects of different SNPs are variable in the process of species interaction. Bacterial interaction was found to exert direct genetic effects, indirect genetic effects and interspecific epistatic effects.

Keywords: Species interaction, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Single nucleotide polymorphism, Systems mapping

地球上的微生物有着极高的丰富度和多样性, 它们的生命活动和相互作用对维持生态系统稳定性起到了关键作用。微生物之间如何进行相互作用一直是生态学研究中的一个重要问题。研究表明^[1]细菌互作影响其对环境的进化响应, 细菌在互作环境中表现出不同的适应性, 适应环境关键取决于种间的相互作用。尽管一些生态学机制已被提出, 但影响细菌互作的遗传机制尚不清楚。

随着测序技术的发展, 科研人员已经可以更加简便和快速地获得越来越多的基因数据^[2], 同时也开始认识到基因在塑造物种的作用方式中起着重要的作用^[3]。但是研究人员对于基因如何参与微生物的相互作用了解有限。遗传作图可以在基因组上找到控制研究表型的数量性状位点(Quantitative trait locus, QTL), 因此常常被拿来研究基因型与表型的关联问题^[4-5]。某些生物性状的形成随着时间的积累而改变, 在这个过程中不同基因的表达时间不同, 研究人员通过数学模型描述性状的发育过程, 将其整合到定位 QTL 的统计框架中, 得到了可以确定基因型和表型关系的方法——功能作图(Functional mapping)^[6-7], 它可以将复杂性状的形成看成是一个动态的过程, 利用反映生长发育的数学

函数和动态模型量化, 以此检测不同个体在不同生长阶段的差异, 可以确定在生长过程中影响性状形成的基因^[8-9]。在此基础上研究人员基于功能作图推导出系统作图(Systems mapping), 这个方法将复杂的性状看作是由几个成分相互作用得到的一个动态系统^[10-11], 系统中各个不同组分相互作用、互相协调共同影响表型的形成与发育。由于整合了常微分方程(ODEs), 系统作图不仅可以识别微生物在相互作用过程中的直接遗传效应, 还能识别上位遗传效应和不同微生物的间接遗传效应。系统作图可以定位得到微生物不同 SNPs 的相互联系, 这可以为性状的形成和发展机制研究提供一个新思路。

微生物丰度作为反映大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌相互作用过程的指标, 在一定时间内随着时间改变而发生变化, 不同菌株之间的生长曲线也会存在较大差异。功能作图可以将同一个选择标记 SNP 与不同生长曲线进行关联分析, 定位在丰度变化过程中影响性状形成的基因, 通过比较发现大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌在单独培养环境和混合培养环境中得到的基因存在较大区别, 因此我们推断在混合培养环境中两种微生物可能会为了资

源而相互合作或者相互竞争从而表现出不同的基因表达情况。因此我们在研究中引入了系统作图的分析方法,这个方法不仅将性状的形成归因于随着时间改变不同基因表达的改变,同时也是不同基因相互影响的结果,通过分析得到基因互作在两种微生物生长发育过程中遗传效应的改变,从而获得细菌互作的直接遗传效应、间接遗传效应和上位遗传效应关系。

本研究选用大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌这两种生物作为研究对象,并对其进行了两两配对,同时设置了单独培养和共同培养两种培养环境,定时测量不同培养环境中大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的生长量变化情况。采用系统作图的方法,结合不同培养环境的生长量变化和不同菌株的重测序结果,探究在共同培养环境中两种微生物丰度变化从而确定两种微生物相互作用过程中的直接遗传效应、间接遗传效应和上位遗传效应,定位得到在相互作用过程中起重要作用的关键基因对。为研究物种相互作用过程和进化提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

45株大肠埃希菌主要来自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)和中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。45株金黄色葡萄球菌分别来自中国林业微生物菌种保藏管理中心(CFCC)、中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)、中国医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC)、中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)、中国农业菌种保藏中心(ACCC)、中国药理学微生物菌种保藏管理中心(CPCC)以及中国农业大学动物医学院惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器

溶菌酶, Amresco 公司; 溶葡萄球菌素, Sigma 公司; 脑心浸液培养基, OXOID 公司; 细菌基因组提取试剂盒、荧光定量预混试剂增强版, 天根生化科技有限公司。荧光定量 PCR 仪, Stratagene 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌的培养

将得到的 45 株大肠埃希菌和 45 株金黄色葡萄球菌进行编号, 对他们单独培养和大肠埃希菌-金黄色葡萄球菌混合共培养。按照每株细菌在单独培养和混合共培养中终浓度为 5×10^3 cells/mL 的原则将其接种到稀释 2 倍的脑心浸液培养基中, 置于 30°C 、130 r/min 的恒温摇床中培养 36 h。并且根据生长规律在 0–2 h、2–12 h、12–24 h、24–36 h 分别每隔 0.5、2、4、6 h 进行一次取样。

1.2.2 细菌全基因组提取和 qPCR

取各个时间点获得的样品 1 mL, 利用细菌基因组提取试剂盒得到细菌 DNA。根据大肠埃希菌编码 β -D-葡萄糖苷酶的 *uidA* (1694260–1696071) 基因和金黄色葡萄球菌中编码耐热核酸酶的 *nuc* (1397756–1398289) 序列设计特异性引物, 并将引物扩增得到的特异性片段克隆到 pMD18-T 载体, 用于制备标准品, 通过 10 倍梯度稀释获得标准曲线, 随后利用两种特异性引物分别对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌进行 qPCR 扩增得到 C_T 值, 并将其代入标准曲线得到不同培养条件下细菌丰度^[12]。具体反应体系为: 2×SuperReal PreMix Plus (with SYBR Green I) 12.5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.75 μL , 50×ROX Reference Dye 0.5 μL , 模板 2 μL , 补 RNase-Free ddH₂O 至总体积 25 μL 。热循环反应条件为: 95°C 10 min; 95°C 30 s, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 共 40 个循环, 退火延伸时检测、收集荧光信号。

1.2.3 细菌基因组测序

将得到的不同菌株基因组样品委托北京诺禾致源科技股份有限公司进行全基因组重测序。利用 HiSeq 2500 对 45 株大肠埃希菌和 45 株金黄色葡萄球菌进行独立测序, 选用 *E. coli* str. K-12 substr. MG1655 和 *S. aureus* subsp. *aureus* NCTC 8325 作为参考基因组, 利用 BWM 软件将得到的有效测序数据与参考基因组进行比对以及 SAMtools 软件对结果进行质量控制, 保证分析结果的有效性^[13]。

1.2.4 表型与基因型关联分析

在系统作图过程中, 不正确的群体结构分析会导致关联结果假阳性, 需要去除群体结构中可能存在的混杂因素, 进而正确推断出细菌表型的遗传基础。Q-ROADTRIPS 可以根据基因组筛选得到数据, 拟合协方差矩阵从而对未知群体结构进行校正^[13]。本研究采用 Q-ROADTRIPS 分别对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌进行群落结构分析, 得到两种细菌不同的亚群, 随后根据亚群个体差异对表型进行调整, 通过将 45 对菌株间的 SNPs 数据和表型数据关联, 建立静态和动态模型来估计 SNP 特异性, 基于静态似然函数和动态似然函数检测种间相互作用中的显著 SNPs^[14]。

2 结果与分析

2.1 微生物生长变化及其表型可塑性

为了确定不同微生物在共存的生态环境中一种微生物的生长是否会受另外一种微生物的影响, 以及他们的表型可塑性, 对收集到的各 45 株大肠埃希菌和 45 株金黄色葡萄球菌进行单独培养和混合培养, 从而比较同一菌株在单独培养和混合培养环境中的生长差异(图 1)。在 36 h 内观察 45 株大肠埃希菌(A)和 45 株金黄色葡萄球菌(B)的单培养(红线)和共培养(蓝线)生长情况, 粗线代表通过生长方程确定的平均适应性。研究发现无论是在单独培养还是在混合培养的环境中两个物种的不同菌株生长曲线都存在较大的差异, 这说明可能

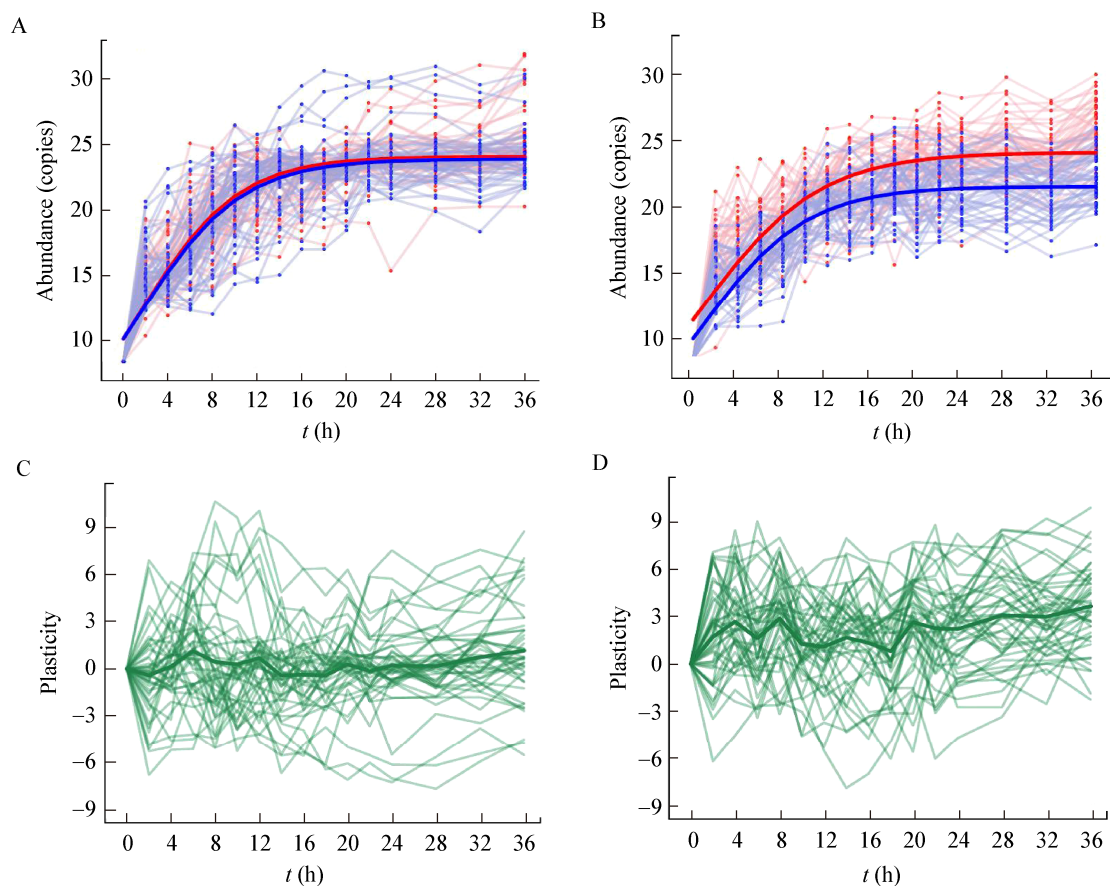


图 1 微生物生长变化及其表型可塑性

Figure 1 Trajectories of microbial growth and its phenotypic plasticity

注: A: 大肠埃希菌生长曲线; B: 金黄色葡萄球菌生长曲线; C: 大肠埃希菌表型可塑性; D 金黄色葡萄球菌表型可塑性。

Note: A: Trajectories of microbial growth for *E. coli*; B: Trajectories of microbial growth for *S. aureus*; C: The phenotypic plasticity of *E. coli*; D: The phenotypic plasticity of *S. aureus*.

存在重要的 SNPs 调节每种环境中微生物的生长。总的来说大肠埃希菌在单独和混合的培养环境中生长情况相差较小(图 1A), 但是金黄色葡萄球菌单独培养的生长情况明显好于混合培养, 表现出明显的表型可塑性(图 1B)。对于两种物种来说不同菌株的基因在应对两种物种共存环境时其表现存在很大不同(图 1C 和 1D)。

2.2 通过功能作图对微生物的生长情况进行全基因组关联分析

利用功能作图定位两种微生物在不同环境中影响其生长的 SNPs (图 2)。虚线对应的是一个在 5% 的水平上由 1 000 个排列测试得到全基因组范围的显著性阈值, 在单独培养的环境中在大肠埃希菌中检测到了总共 30 个影响其生长的 SNPs, 但是在共同培养的环境中仅检测到了 3 个 SNPs (图 2A)。对于金黄色葡萄球菌来说, 在单独和混合培养环境中分别检测到了 5 个和 4 个 SNPs (图 2B)。可以看到在单独和混合培养中检测到的 SNPs 是完全不同的, 因此考虑导致这些不同结果的原因可能是两种微生物在生长过程中为了争夺资源而产生竞争或者合作。

2.3 通过系统作图检测在两种共存微生物中相互作用的 SNPs

利用系统作图获得了 54 对显著 SNPs 组合,

这些组合来自大肠埃希菌中 41 个显著 SNPs 和金黄色葡萄球菌中 12 个显著 SNPs (图 3A), 通过系统作图检测到的显著的 SNPs 数量明显大于传统的功能作图, 并且大于在单独培养环境中检测到的 SNPs 数量。这说明一个物种在面对和他共存的生物时一些基因可能会被激活。为了说明系统作图是如何定量地分析 SNPs 对两个物种相对丰度的影响, 从大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌中选择了具有种间组合代表性的 SNP E4614704 和 SNP S188004。绘制了不同培养环境中这两个 SNPs 的基因型生长曲线, 从中确定其遗传效应随着时间变化的轨迹和对应 SNPs 对物种共存的敏感性。S188004 在单独培养和混合培养中均对金黄色葡萄球菌的生长产生影响, 但在单独培养环境中其遗传效应从零迅速上升到峰值然后逐渐下降, 但是在混合培养环境中其遗传效应从一开始就表现出较强的作用, 随后迅速下降(图 3B)。这个位置上两种不同的碱基 C 和 T 都对生物相互作用表现出一定程度的敏感性。E4614704 在单独培养环境中其遗传效应明显较强, 但在共存环境中遗传效应影响减弱。因为碱基 C 对物种相互作用是稳定的, 所以这种差异可能是因为碱基 T 对物种相互作用具有高度的敏感性(图 3C)。从中可以发现 E4614704 和 S188004 对微生物生长的直接遗传效应($a_{c \leftarrow c}$, $a_{s \leftarrow s}$)在混合培养环

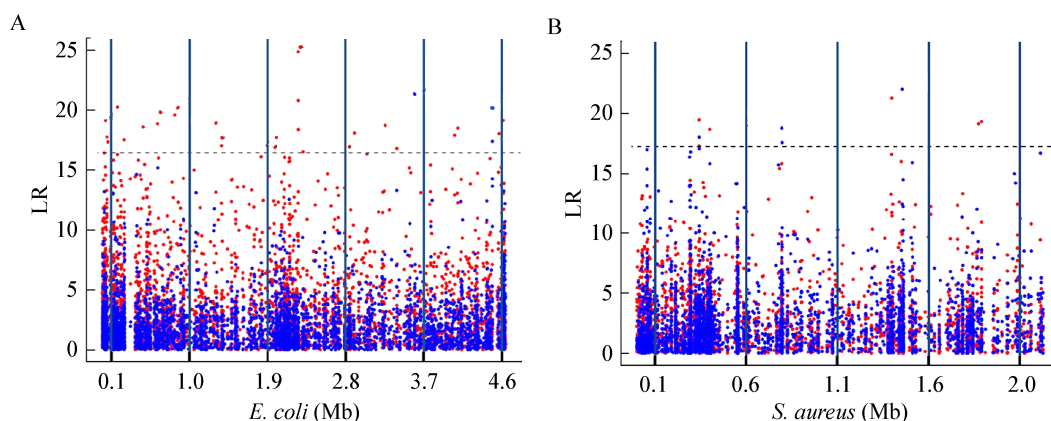


图 2 功能作图得到微生物生长全基因组关联曼哈顿图

Figure 2 Manhattan plot of genome-wide associations for microbial growth by functional mapping

注: A: 大肠埃希菌曼哈顿图; B: 金黄色葡萄球菌曼哈顿图.

Note: A: Manhattan plot of *E. coli*; B: Manhattan plot of *S. aureus*.

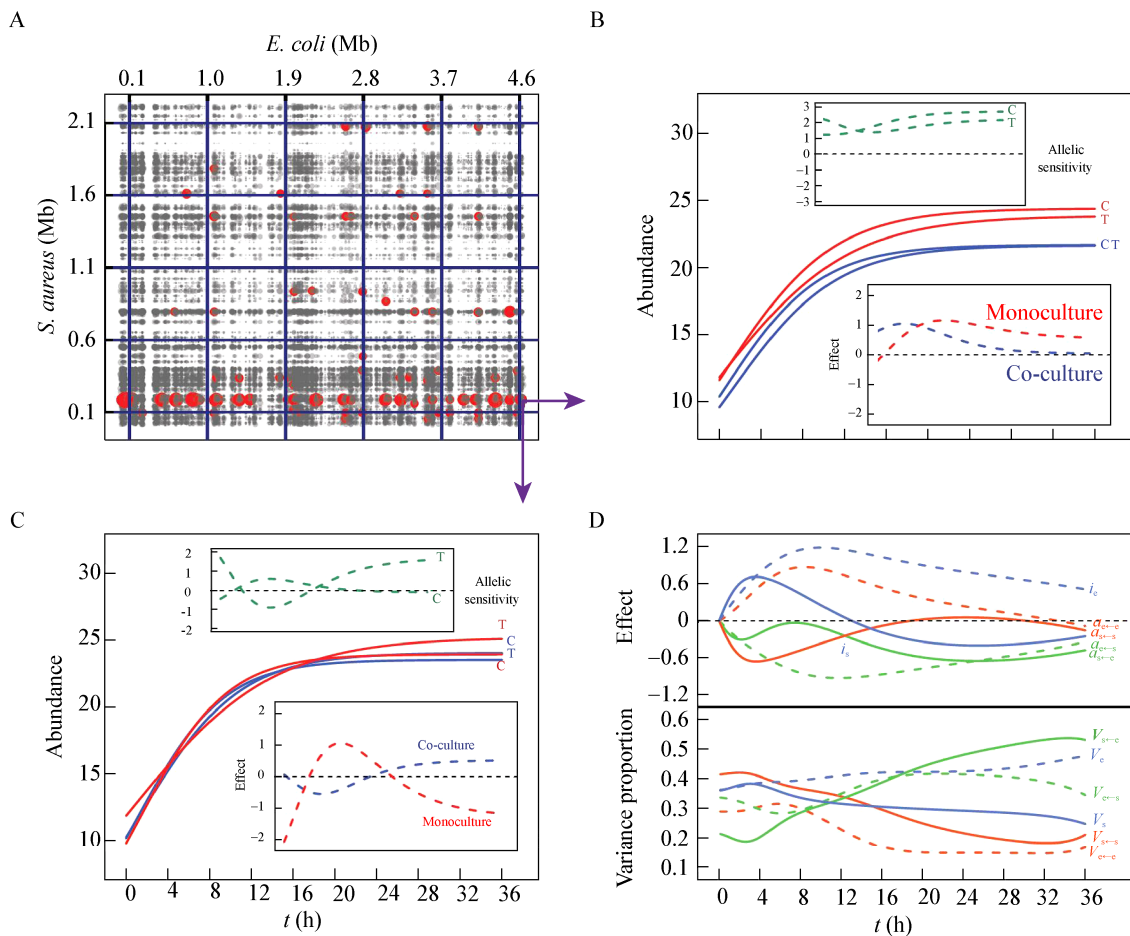


图3 通过系统作图检测两种微生物共存环境中微生物生长相关的相互作用 SNP 对

Figure 3 Detection of significant interspecific SNP pairs for microbial growth of two coexisting species by systems mapping

注: A: 大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌三维曼哈顿图; B: SNP S188004 的不同碱基菌株丰度及其基因效应; C: SNP E4614704 的不同碱基菌株丰度及其基因效应; D: E4614704 和 S188004 的直接遗传效应, 间接遗传效应和上位效应。

Note: A: The three-dimensional Manhattan plot of *E. coli* and *S. aureus*; B: The abundance and genetic effects of SNP S188004; C: The abundance and genetic effects of SNP E4614704; D: Trajectories of direct genetic effects, indirect genetic effects and interspecific epistatic effects between E4614704 and S188004.

境中明显小于单独培养环境。除此之外 E4614704 和 S188004 被发现具有相当大的间接遗传效应 ($a_{e \leftarrow s}$, $a_{s \leftarrow e}$) 和种间上位效应 (i_e , i_s) (图 3D)。从图 3D 中可以发现金黄色葡萄球菌的 S188004 比大肠埃希菌的 E4614704 更能直接影响大肠埃希菌的生长。可见, 两种细菌间接遗传效应和种间上位效应对共培养时的生长轨迹具有较大程度的影响。通过遗传效应曲线可以看到随着时间变化一个 SNP 是如何影响微生物生长的。在这个特定的 SNP 组合中, 大肠埃希菌的直接、间接和上位遗传效应在

8–12 h 内达到最大值, 而对金黄色葡萄球菌来说其 3 种不同的遗传效应有一定的周期性。总的来说, 这些 SNPs 对两种物种的直接影响都有随时间减少的趋势。

2.4 部分显著 SNPs 所在候选基因编码蛋白的生物学功能

检测到的显著 SNPs 所定位的候选基因进行了基因注释(表 1), 并且部分基因已经有文献报道了其详细功能, 其中 *nhaR* (E19056) 是转录调控因子 LysR 家族的 DNA 结合蛋白, 这个基因可以激活

表 1 通过系统作图得到的来自大肠埃希菌 42 个 SNPs 和金黄色葡萄球菌 12 个 SNPs 组成的 54 对显著 SNPs 的基因注释

Table 1 Gene annotations of 54 significant SNP pairs detected between 41 SNPs from *E. coli* and 12 SNPs from *S. aureus* co-culture and monoculture by systems mapping

Pairs	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Pairs	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1	<i>nhaR</i> (E19056)	<i>ggt</i> (S188004)	28	<i>yeiI</i> (E2252539)	<i>ggt</i> (S188004)
2	<i>kefC</i> (E49080)	<i>ggt</i> (S188004)	29	<i>nupX</i> (E2252925)	<i>ggt</i> (S188004)
3	<i>rapA</i> (E62059)	<i>ggt</i> (S188004)	30	– (E2568153)	<i>ggt</i> (S188004)
4	<i>aceF</i> (E126510)	<i>ggt</i> (S188004)	31	<i>tmcA</i> (E2594191)	<i>hp</i> (S56698)
5	<i>mdlA</i> (E470127)	<i>ggt</i> (S188004)	32	<i>tmcA</i> (E2594191)	<i>ebp</i> (S1454572)
6	<i>ybdL</i> (E633990)	<i>ggt</i> (S188004)	33	<i>tmcA</i> (E2594191)	<i>hp</i> (S2076600)
7	<i>sucA</i> (E759230)	– (S1612255)	34	<i>csiD</i> (E2789300)	– (S936893)
8	<i>rhIE</i> (E832164)	<i>ggt</i> (S188004)	35	<i>gutQ</i> (E2830623)	<i>hp</i> (S2076600)
9	<i>iaaA</i> (E866870)	<i>ggt</i> (S188004)	36	<i>bglA</i> (E3044738)	<i>ggt</i> (S188004)
10	<i>ghrA</i> (E1098633)	<i>ggt</i> (S188004)	37	– (E3056867)	<i>ggt</i> (S188004)
11	<i>ghrA</i> (E1098633)	<i>hp</i> (S342015)	38	– (E3056867)	<i>spIA</i> (S867513)
12	<i>trpA</i> (E1317124)	<i>ggt</i> (S188004)	39	<i>aer</i> (E3218576)	<i>hp</i> (S342015)
13	<i>pspF</i> (E1367778)	<i>ggt</i> (S188004)	40	<i>aer</i> (E3218576)	– S1612255
14	<i>pspF</i> (E1367778)	– (S342015)	41	<i>ygiK</i> (E3228896)	<i>ggt</i> (S188004)
15	<i>hrpA</i> (E1483999)	<i>ggt</i> (S188004)	42	<i>greA</i> (E3328548)	<i>hp</i> (S342015)
16	<i>hrpA</i> (E1483999)	<i>ggt</i> (S188004)	43	– (E3539826)	– (S1612255)
17	<i>astB</i> (E1827957)	<i>hp</i> (S342015)	44	– (E3539840)	– (S323313)
18	<i>ynjC</i> (E1838489)	– (S1612255)	45	– (E3544071)	<i>hp</i> (S56698)
19	<i>rsmF</i> (E1920546)	<i>hp</i> (S342015)	46	– (E3544071)	<i>hp</i> (S2076600)
20	<i>yecC</i> (E1997109)	– (S119378)	47	<i>ilvA</i> (E3956003)	<i>ggt</i> (S188004)
21	<i>yecC</i> (E1997109)	<i>hp</i> (S289329)	48	<i>rhaD</i> (E4093625)	<i>ggt</i> (S188004)
22	<i>yecC</i> (E1997109)	– (S936893)	49	<i>yjiX</i> (E4127415)	<i>hp</i> (S56698)
23	<i>yecC</i> (E1997109)	<i>ebp</i> (S1454572)	50	<i>yjiX</i> (E4127415)	<i>ebp</i> (S1454572)
24	<i>fliC</i> (E2002296)	<i>ggt</i> (S188004)	51	<i>yjiX</i> (E4127415)	<i>hp</i> (S2076600)
25	<i>yehM</i> (E2206895)	– (S936893)	52	<i>phnI</i> (E4320079)	<i>ggt</i> (S188004)
26	– (E2233954)	<i>ggt</i> (S188004)	53	<i>phnI</i> (E4320079)	– (S337827)
27	<i>yeiI</i> (E2252539)	<i>ggt</i> (S188004)	54	<i>yjiW</i> (E4614704)	<i>ggt</i> (S188004)

注：–：位于 2 个基因之间。

Note: –: Located between two genes.

pgaABCD 操纵子从而产生生物膜粘附素，生物膜粘附素可以使革兰氏阴性菌和金黄色葡萄球菌的生物膜结构更加稳定。候选基因 *sucA* (E759230) 参与生物体内十分重要的三羧酸循环(TCA)。*rhIE* (E832164)编码的蛋白功能是 ATP 酶和 RNA 解旋

酶。*csiD* (E2789300)可以构成一个由 σ^S 因子控制的基因簇 *csiD-ygaF-gabDTP*，它可以在碳源缺乏时被激活从而应对饥饿压力。*alkB* (E2309274)基因编码的 AlkB 蛋白参与烷基化损伤后的细胞恢复。*yjiW* (E4614704)基因编码丙酮酸-甲酸裂解酶激活

酶同系物。

3 讨论与结论

生物的进化离不开物种之间的相互作用和其所在环境的影响。由于微生物在自然界中分布广泛,物种间相互作用在微生物中更加常见。物种之间的生态相互作用实际上遍及自然界各个群落,而这些群落能够根据不断变化的环境改变其组成和适应能力。我们已经清楚地认识到,物种间的相互作用可以推动物种的进化,它推动着物种随着时间的推移而发生变化。物种间的相互作用被认为是一种可以随着时间推动进化的力量^[15]。

本研究通过系统作图找到大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌在相互作用过程中起重要作用的 QTL,并通过基因注释定位到了这些位点所在的候选基因。在已有文献报道的候选基因中 *nhaR* (E19056)是转录调控子 LysR 家族的 DNA 结合蛋白,这个蛋白可以激活大肠埃希菌生物膜粘附素产生所必需的 *pgaABCD* 操纵子的转录,生物膜粘附素可以使大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的生物膜结构更加稳定^[16]。生物膜的存在使细胞可以在恶劣的环境中生存^[17]。从生物化学的角度分析 *rhlE* (E832164)编码的 RhlE 蛋白具有 ATP 酶和 RNA 解旋酶的功能^[18],其具有的 RNA 解旋酶功能可以参与调控核糖体的组装过程^[19]。 σ^S 因子可以控制调节由 *csiD* (E2789300)基因形成的 *csiD-ygaF-gabDTP* 基因簇^[20],它是 RNA 聚合酶的亚基,在细胞面对外界营养物质缺乏的环境时它可以被激活表达^[21]。大肠埃希菌中 *alkB* (E2309274)基因编码的 AlkB 蛋白是一种 DNA 修复酶,可以参与 DNA 损伤的修复^[22]。*sucA* (E759230)编码 α -酮戊二酸脱氢酶的 E1 亚基,催化 α -酮戊二酸氧化脱羧,生成琥珀酰辅酶 a 和二氧化碳,同时生成 NADH。这种酶参与细胞生物合成中间产物的产生和三羧酸(TCA)循环中能量的生成,TCA 循环是氧化代谢的中心通路^[23]。*yjjW* (E4614704)基因编码丙酮酸-甲酸裂解酶激活酶同系物^[24]。丙酮酸

作为代谢途径的关键中间产物可以通过糖异生等转化为碳水化合物。我们对得到的显著 SNPs 定位得到了这些候选基因,他们在已报道的文献中有着明显的生物学功能。*nhaR* (E19056)参与生物膜的形成,*rhlE* (E832164)与核糖体的组装有关,*csiD* (E2789300)的表达可以应对细胞面对的恶劣环境,*alkB* (E2309274)可以参与 DNA 的损伤修复,*sucA* (E759230)和 *yjjW* (E4614704)都参与细胞的代谢过程。这些功能都可以直接或者间接影响微生物的生长量变化,从而影响两种微生物相互作用方式。

微生物的相互作用是微生物群落研究的重要组成部分,长期以来,对相互作用的基因解析工作一直是现代生物学核心的研究内容之一。随着测序技术的发展我们已经可以快速获取大量实验样本的基因组数据,但是如何将这些数据与我们研究的表型关联起来一直是个难题。本研究在实验室环境下建立了大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的相互作用的环境,并以两种微生物的生长丰度变化作为反映相互作用情况的具体表型,结合反映生物生长的数学模型、微分方程和两种细菌的重测序数据定位得到在相互作用过程中起重要作用的 SNPs,以及这些 SNPs 之间的直接遗传效应、间接遗传效应和上位性遗传效应,为人们研究物种相互作用机制和进化过程提供了新的思路。

REFERENCES

- [1] Lawrence D, Fiegna F, Behrends V, et al. Species interactions alter evolutionary responses to a novel environment[J]. PLoS Biology, 2012, 10(5): e1001330
- [2] Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, et al. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing[J]. Nature Reviews Genetics, 2011, 12(7): 499-510
- [3] Whitham TG, Bailey JK, Schweitzer JA, et al. A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems[J]. Nature Reviews Genetics, 2006, 7(7): 510-523
- [4] Lander ES, Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps[J]. Genetics, 1989, 121(1): 185-199
- [5] Mackay TFC, Stone EA, Ayroles JF. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(8): 565-577

- [6] Wu RL, Lin M. Functional mapping — how to map and study the genetic architecture of dynamic complex traits[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(3): 229-237
- [7] Li ZT, Sillanpää MJ. Dynamic quantitative trait locus analysis of plant phenomic data[J]. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(12): 822-833
- [8] Wang Z, Pang XM, Lv YF, et al. A dynamic framework for quantifying the genetic architecture of phenotypic plasticity[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2013, 14(1): 82-95
- [9] Wang Z, Wang NT, Wu RL, et al. jGWAS: an R package for genome-wide association analysis with longitudinal phenotypes[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2018, 45(7): 411-413
- [10] Sun LD, Wu RL. Mapping complex traits as a dynamic system[J]. *Physics of Life Reviews*, 2015, 13: 155-185
- [11] Wu RL, Cao JG, Huang ZW, et al. Systems mapping: how to improve the genetic mapping of complex traits through design principles of biological systems[J]. *BMC Systems Biology*, 2011, 5: 84
- [12] Chen N, Zhu J, Ye MX, et al. Interactions between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* determined by genome-wide association analysis[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(4): 526-538 (in Chinese)
陈南, 朱璟, 叶梅霞, 等. GWAS 研究大肠杆菌和金黄色葡萄球菌种间互作进化机制[J]. *微生物学报*, 2017, 57(4): 526-538
- [13] He XQ, Jin Y, Ye MX, et al. Bacterial genetic architecture of ecological interactions in co-culture by GWAS-Taking *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as an example[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2332
- [14] Jiang LB, He XQ, Jin Y, et al. A mapping framework of competition-cooperation QTLs that drive community dynamics[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3010
- [15] Thompson JN. The evolution of species interactions[J]. *Science*, 1999, 284(5423): 2116-2118
- [16] Goller C, Wang X, Itoh Y, et al. The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates *pgaABCD* transcription, required for production of the biofilm adhesin Poly- β -1, 6-*N*-Acetyl-D-glucosamine[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 188(23): 8022-8032
- [17] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(2): 95-108
- [18] Bizebard T, Ferlenghi I, Iost I, et al. Studies on three *E. coli* DEAD-Box helicases point to an unwinding mechanism different from that of model DNA helicases[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(24): 7857-7866
- [19] Jain C. The *E. coli* RhlE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly[J]. *RNA*, 2008, 14(2): 381-389
- [20] Metzner M, Germer J, Hengge R. Multiple stress signal integration in the regulation of the complex σ^S -dependent *csiD-ygaF-gabDTP* operon in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 51(3): 799-811
- [21] Huisman GW, Kolter R. Sensing starvation: a homoserine lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*[J]. *Science*, 1994, 265(5171): 537-539
- [22] Falnes PØ, Johansen RF, Seeberg E. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 2002, 419(6903): 178-182
- [23] Li M, Ho PY, Yao SJ, et al. Effect of *sucA* or *sucC* gene knockout on the metabolism in *Escherichia coli* based on gene expressions, enzyme activities, intracellular metabolite concentrations and metabolic fluxes by ^{13}C -labeling experiments[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 30(3): 286-296
- [24] Kolker E, Makarova KS, Shabalina S, et al. Identification and functional analysis of 'hypothetical' genes expressed in *Haemophilus influenzae*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(8): 2353-2361