

鼠伤寒沙门氏菌 *baeR* 过表达株的构建及其耐药性

高海侠, 卢芳, 姜西迪, 魏祺灵, 漆彩丽, 张临, 付恒峰, 李琳*

安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036

高海侠, 卢芳, 姜西迪, 魏祺灵, 漆彩丽, 张临, 付恒峰, 李琳. 鼠伤寒沙门氏菌 *baeR* 过表达株的构建及其耐药性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 659-678

Gao Haixia, Lu Fang, Jiang Xidi, Wei Qiling, Qi Caili, Zhang Lin, Fu Hengfeng, Li Lin. Construction and antibiotic resistance of a *Salmonella typhimurium* strain overexpressing *baeR*[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 659-678

摘要: 【背景】鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)是一种重要的人兽共患病原菌, 其多重耐药性问题日益严重, 双组分系统可调控鼠伤寒沙门氏菌的耐药性。【目的】通过构建鼠伤寒沙门氏菌 *baeR* 过表达株及回补株探究 BaeSR 双组分系统对鼠伤寒沙门氏菌耐药性的影响。【方法】在 BaeSR 双组分系统和 AcrB 外排泵双缺失株 (CR Δ *baeSR* Δ *acrB*) 的基础上构建 *baeR* 过表达株 (CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB*) 及 *baeR* 回补株 (CR*cbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB*), 测定双缺失株、回补株和过表达株的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC), 并对其生长特性、生物膜形成能力及运动性进行分析。采用转录组学技术筛选与耐药相关的差异表达基因, RT-qPCR 验证耐药相关基因。【结果】构建了鼠伤寒沙门氏菌 *baeR* 过表达株和 *baeR* 回补株。与双缺失株相比, 过表达株对氧氟沙星、恩诺沙星、氟苯尼考、乙酰甲喹、头孢他啶、头孢噻唑、阿莫西林和氨苄西林的 MIC 分别升高 2–256 倍, 对大观霉素、安普霉素的 MIC 下降了 50%; 与双缺失株相比, 回补株对头孢他啶、头孢噻唑、氟苯尼考、恩诺沙星的 MIC 分别升高了 2 倍; 与双缺失株相比, 过表达株和回补株的生长速率无明显变化, 生物膜形成能力及运动能力极显著升高 ($P < 0.01$)。转录组学分析表明 CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB*/CR Δ *baeSR* Δ *acrB* 比较组共筛选到 743 个差异表达基因 (上调 724 个, 下调 19 个), 差异表达基因主要富集在 β -内酰胺抗性、群体感应系统和双组分系统等通路中; CR*cbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB*/CR Δ *baeSR* Δ *acrB* 比较组共筛选到 3 073 个差异表达基因 (上调 1 467 个, 下调 1 606 个), 差异表达基因主要富集在碳代谢、氨基酸的生物合成和抗生素的生物合成等通路中。筛选出 15 个外排泵、鞭毛、生物膜、双组分系统及外膜蛋白等耐药相关差异表达基因, 随机选取 5 个差异表达基因进行 RT-qPCR 验证, 趋势与转录组一致。【结论】*baeR* 过表达后通过调控生物膜形成及运动性从而介导鼠伤寒沙门氏菌对多种药物的耐药性。转录组学测序结果显示, 15 个耐

基金项目: 安徽农业大学研究生创新基金(2020ysj-24); 国家自然科学基金面上项目(31772802)

Supported by: Innovation Fund for the Post-Graduates of Anhui Agricultural University (2020ysj-24); National Natural Science Foundation of China (31772802)

*Corresponding author: E-mail: lilinah@126.com

Received: 2021-06-20; Accepted: 2021-08-10; Published online: 2021-10-21

药相关基因显著差异表达,表明 *baeR* 过表达后可通过调节外排泵、生物膜和鞭毛等相关基因的表达影响鼠伤寒沙门氏菌的耐药性。

关键词: 鼠伤寒沙门氏菌; 双组分系统; 耐药性; 基因过表达; 转录组学

Construction and antibiotic resistance of a *Salmonella typhimurium* strain overexpressing *baeR*

GAO Haixia, LU Fang, JIANG Xidi, WEI Qiling, QI Caili, ZHANG Lin, FU Hengfeng, LI Lin*

College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

Abstract: [Background] *Salmonella typhimurium* is a major zoonotic pathogen, and its multi-drug resistance is becoming increasingly serious. The two-component system can regulate the resistance of *S. typhimurium*. [Objective] We constructed the *baeR*-overexpressing strain and complementary strain of *S. typhimurium* to study the effect of BaeSR on the antibiotic resistance of *S. typhimurium*. [Methods] A complementary strain (CR*baeR*Δ*baeSR*Δ*acrB*) and an overexpression strain (CR*pbaeR*Δ*baeSR*Δ*acrB*) were constructed based on a *baeSR* and *acrB* double-deletion strain of *S. typhimurium* (CRΔ*baeSR*Δ*acrB*), and their antimicrobial susceptibility and biological characteristics were tested. RNA-Seq was used to screen the differentially expressed genes (DEGs) related to drug resistance, and RT-qPCR was conducted to verify some drug-related genes. [Results] The *baeR*-overexpressing strain and complementary strain were successfully constructed. Compared with that in CRΔ*baeSR*Δ*acrB*, the minimum inhibitory concentrations (MICs) of ofloxacin, enrofloxacin, florfenicol, mequindox, ceftazidime, ceftiofur, amoxicillin, and ampicillin increased by 2–256 folds while that of spectinomycin and apramycin decreased by 50% in CR*pbaeR*Δ*baeSR*Δ*acrB*. The MIC of ceftazidime, ceftiofur, florfenicol, and enrofloxacin was two-fold higher in CR*baeR*Δ*baeSR*Δ*acrB* than in CRΔ*baeSR*Δ*acrB*. The growth curves of CRΔ*baeSR*Δ*acrB*, CR*pbaeR*Δ*baeSR*Δ*acrB*, and CR*baeR*Δ*baeSR*Δ*acrB* showed no significant difference. However, the biofilm-forming ability and motility of CR*pbaeR*Δ*baeSR*Δ*acrB* and CR*baeR*Δ*baeSR*Δ*acrB* were significantly higher than those of CRΔ*baeSR*Δ*acrB* ($P < 0.01$). A total of 743 DEGs were identified between CR*pbaeR*Δ*baeSR*Δ*acrB* and CRΔ*baeSR*Δ*acrB*, including 724 upregulated genes and 19 downregulated genes. Bioinformatics analysis showed that the DEGs were mainly enriched in pathways such as β-lactam resistance, quorum sensing, and two-component system. A total of 3 073 DEGs were identified between CR*baeR*Δ*baeSR*Δ*acrB* and CRΔ*baeSR*Δ*acrB*, including 1 467 upregulated genes and 1 606 downregulated genes. These DEGs were mainly enriched in pathways such as carbon metabolism, biosynthesis of amino acids, and biosynthesis of antibiotics. A total of 15 drug resistance-related DEGs were screened out, mainly involving efflux pump, biofilm, and two-component system. Five out of the 15 DEGs were randomly selected for RT-qPCR, which showed consistent results and confirmed the reliability of RNA-Seq results. [Conclusion] This study indicates that *baeR* affects the drug resistance of *S. typhimurium* by regulating its biofilm-forming ability and motility. RNA-Seq screened out 15 resistance-related DEGs, indicating that *baeR* overexpression can affect the drug resistance of

S. typhimurium by regulating the expression of the genes associated with efflux pump, biofilm and flagella.

Keywords: *Salmonella typhimurium*; two-component system; drug resistance; gene overexpression; transcriptomics

沙门氏菌是一种重要的人兽共患病原菌, 其可引起动物发病, 也可通过污染动物产品如肉、蛋、奶等引起人发病。近年来随着畜牧业的快速发展, 大量抗菌药物被用于预防和治疗沙门氏菌感染, 但由于其在动物临床上的广泛及不合理使用, 不仅使动物性食品中残留了大量的抗菌药物, 而且也导致了沙门氏菌多重耐药株的出现, 给人们的健康带来了严重威胁, 因此深入了解沙门氏菌的多药耐药机制及保护动物性食品安全已成为重中之重。研究表明, 双组分系统与外排泵在沙门氏菌耐药中发挥着重要作用, 可以作为降低细菌耐药性的抗菌作用新靶点^[1]。

双组分系统(two-component system, TCS)普遍存在于细菌中, 可调节包括运动性、毒力、新陈代谢、抗生素耐药性和应激反应等过程^[2]。在多数情况下, TCS 对抗生素的存在直接产生反应, 能够介导细菌对抗生素产生耐药性。BaeSR 双组分系统最初是在大肠杆菌中被发现^[3], 之后在鼠伤寒沙门氏菌中发现^[4]。BaeSR 双组分系统由定位在细胞膜上的组氨酸蛋白激酶 BaeS 和胞浆中与 DNA 结合的反应调节因子 BaeR 组成, 在膜压力作用下, 活化的 BaeS 导致 BaeR 磷酸化, 从而激活相关基因转录^[5]。Nishino 等^[6]研究表明, 由于 *acrB* 的存在会掩盖 *baeR* 过表达对大肠杆菌的耐药性, 所以在 *acrB* 缺失的基础上过表达 *baeR* 赋予了大肠杆菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药性。Wang 等^[7]的研究也表明, 在 *acrB* 缺失的基础上过表达 *baeR*, 对头孢噻吩和头孢噻肟的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 分别升

高 2.5 倍和 2.0 倍, 同时显著降低外膜蛋白基因 *ompC*、*ompF*、*ompA* 和 *ompX* 的表达水平。在鲍曼不动杆菌中, *baeR* 的过表达增强了对替加环素的耐药性^[8]。在最新的研究中也证实了 BaeSR 双组分系统通过调控 AdeIJK 和 AdeABC 外排泵的表达影响替加环素的耐药性^[9]。此外, BaeSR 双组分系统还可以通过调控外膜蛋白的表达来介导细菌对抗生素的耐药性。在鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 中, BaeR 通过结合到外膜蛋白 OmpW 和 STM3031 的启动子区赋予沙门氏菌对头孢曲松的抗性; 当 *baeSR* 缺失后, 通过下调 *ompC*、*vacJ* 和 *acrD* 的 mRNA 水平降低了 *baeSR* 缺失株对头孢曲松、庆大霉素和氯霉素等药物的耐药性^[10]。此外, *baeSR* 缺失后还可以下调 YejA、OppA、AphA 和 FilD 等蛋白的表达量, 从而降低菌株对多种抗生素的耐药性^[11]。这些结果均表明 BaeSR 双组分系统可以调控细菌的耐药性。

目前, 很多研究都已证明 BaeSR 双组分系统和 AcrB 外排泵都参与调控沙门氏菌耐药性。但由于 AcrB 的存在会掩盖其他外排泵的功能, 使 BaeSR 不能完全发挥作用, 从而不能完全阐明 BaeSR 是如何在沙门氏菌耐药性中发挥作用的。因此, 本研究在 *baeSR* 和 *acrB* 双缺失株的基础上构建 *baeR* 回补株及 *baeR* 过表达株, 分析双缺失株、*baeR* 回补株及 *baeR* 过表达株的生长特性、抗菌药物敏感性、运动及生物膜形成能力, 采用转录组学技术筛选出 3 株菌的耐药相关差异表达基因, 并进行 RT-qPCR 验证, 以期深入阐明 BaeSR 双组分系统对鼠伤寒沙门氏菌产生的耐药机制提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) ATCC 13311 体外诱导环丙沙星耐药株 CR 的 *baeSR* 和 *acrB* 基因双缺失株(CR Δ *baeSR* Δ *acrB*)^[12], pUC19 质粒、*Escherichia coli* ATCC 25922 为实验室保存; 回补质粒 pBAD33cm-rp4、*E. coli* β 2163 和 *E. coli* DH5 α 购自广州诺晶生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂及培养基

质粒小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒, 康宁生命科学(吴江)有限公司; PrimerSTAR Max DNA Polymerase、DNA Marker, TaKaRa 公司; *Hind* III 内切酶、*Bam*H I 内切酶, 上海碧云天生物技术有限公司; Transgen 反转录试剂盒、ClonExpress II, 南京诺唯赞生物科技有限公司; Knogen 试剂盒, 广州诺晶生物技术有限公司; Spark DNA Quick Ligation Kit, 山东思科捷生物技术有限公司; UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 恩诺沙星、氧氟沙星、头孢噻唑、头孢他啶、氨苄西林、阿莫西林、庆大霉素、大观霉素、美罗培南、乙酰甲喹、四环素、安普霉素、磺胺甲恶唑、磺胺异恶唑、黏菌素、氟苯尼考均购自中国兽医药品监察所。

MH 肉汤培养基、LB 肉汤培养基, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 中公布的鼠伤寒沙门氏菌的基因组序列(GenBank 登录号 CP009102.1), 利用 Primer 5.0 设计 *baeR* 过表达引物构建过表达株(*baeR* 片段扩增 *baeR*-BF/*baeR*-BR), *baeR* 回

补引物构建回补株(载体扩增引物 pBAD30-ZF/pBAD30-ZR, *baeR* 片段扩增 *baeR*-RF/*baeR*-RR, pBAD33cm 质粒扩增引物 RP-FF/RP-FR 及回补克隆检测 pBAD-TF/pBAD-TR)。使用 Oligo 6.0 设计 *baeR*、*pmrF*、*mdtD*、*ompW*、*fliC* 和 *sodB* 的引物用于 RT-qPCR 分析。各引物序列见表 1。

1.2.2 *baeR* 回补株的构建

将 CR Δ *baeSR* Δ *acrB* 与含有回补质粒 pBAD33cm-rp4 (氯霉素抗性 Cm) 的 *E. coli* β 2163 进行共培养, 37 °C 培养 6 h, 培养后的菌液划线于 LB 平板(20 μ g/mL Cm) 37 °C 培养过夜, 挑取纯化后单克隆置于 LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 培养过夜, 以菌液为模板, RP-FF/RP-FR 为引物扩增 *baeR* 基因片段。PCR 反应体系(25 μ L): PrimerSTAR Max DNA Polymerase 12.5 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 56 °C 20 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。

在缺失株中检测回补质粒。以 CR 基因组为模板, *baeR*-RF/*baeR*-RR 为引物扩增 *baeR* 基因片段, PCR 反应体系(50 μ L): PrimerSTAR Max DNA Polymerase 25 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 56 °C 20 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。

以 pBAD33cm-rp4 质粒为模板, pBAD30-ZF/pBAD30-ZR 为引物, 扩增 pBAD33cm-rp4 载体片段, PCR 反应体系(50 μ L): PrimerSTAR Max DNA Polymerase 25 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 56 °C 20 s, 72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Primers	引物序列 Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
<i>baeR</i> -BF	CCCAAGCTTATGACTGAATTACCCATTGATGAA	741
<i>baeR</i> -BR	CGCGGATCCTTATACCAGGCGACACGCAT	
pBAD30-ZF	CTAGAGTCGACCTGCAGGCA	5 529
pBAD30-ZR	AGCTCGAATTCGCTAGCCCA	
<i>baeR</i> -RF	TGGGCTAGCGAATTCGAGCTAGGAGGAATTCACCATGACTGAATTACCC	774
<i>baeR</i> -RR	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGTTATACCAGGCGACACGCATC	
RP-FF	CGAATTGGGTACCAGCGCTT	273
RP-FR	TACCGTCGACGCCGCGCCAGC	
pBAD-TF	CCATAAGATTAGCGGATCCTACCT	881
pBAD-TR	CTTCTCTCATCCGCCAAAACAG	
<i>baeR</i> -ZF	ATCATGGCGACAAGGTACTG	118
<i>baeR</i> -ZR	GAAAAACGGCGAATCTCCC	
<i>pmrF</i> -ZF	GGACTGCTGGGCGAATACAT	95
<i>pmrF</i> -ZR	GACGTGCTTTCCGGGTAGAT	
<i>mdtD</i> -ZF	CGGAATGCTGCTGGGTATG	114
<i>mdtD</i> -ZR	GCCGGTAGCGCGATAATAAC	
<i>ompW</i> -ZF	GAGGCGCAATTAACCAGTC	94
<i>ompW</i> -ZR	GGCTGTCCGATCTGAGCTTT	
<i>fliC</i> -ZF	TTCAGTGGTCTGCGCAATG	125
<i>fliC</i> -ZR	TCAACAGCGCGAAAGACGAT	
<i>sodB</i> -ZF	TTGATAGCGGCATCGGTGAA	156
<i>sodB</i> -ZR	TAATAACGCCGCTCAGGTGT	

将扩增的 *baeR* 片段与载体片段使用 Knogen 试剂盒纯化, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。用重组酶 Exnase II (ClonExpress II) 将目的基因片段与载体片段无缝克隆连接, 重组产物转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。涂布于 LB 平板($20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ Cm), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。提取质粒并转化到 *E. coli* β 2163 感受态细胞, 涂布 LB 平板[$20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ Cm, 邻苯二甲酸二烯丙酯(diallyl phthalate, DAP) $0.3\text{ mmol}/\text{L}$], 挑取阳性克隆检测。将双缺失株 CR Δ *baeSR* Δ *acrB* 与大肠杆菌 β 2163 (含质粒 pBAD33cm-rp4-*baeR*) $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 共培养过夜, 培养后的菌液划线 LB 平板($20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ Cm) $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。筛选重组克隆(只有转入了 *baeR*-PBAD33cm-rp4 重组质粒的缺失株能存活)。

以菌液为模板, pBAD-TF/pBAD-TR 为引物进行 PCR 鉴定, PCR 反应体系($25\text{ }\mu\text{L}$): PrimerSTAR Max DNA Polymerase $12.5\text{ }\mu\text{L}$, 正、反向引物($10\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$)各 $1\text{ }\mu\text{L}$, 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$, ddH $_2$ O $9.5\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min ; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s , $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 min 。

将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。构建成功的回补株命名为 CR*baeR* Δ *baeSR* Δ *acrB*。

1.2.3 *baeR* 过表达株的构建

以 CR 基因组为模板, *baeR*-RF/*baeR*-RR 为引物扩增 *baeR* 基因片段, PCR 反应体系($50\text{ }\mu\text{L}$): PrimerSTAR Max DNA Polymerase $25\text{ }\mu\text{L}$, 正、

反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 模板 2 μL , ddH₂O 21 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收。用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 *baeR* 基因与 pUC19 质粒, 酶切产物用 Spark DNA Quick Ligation Kit 连接, 连接产物转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 涂布在含有氨苄西林(50 $\mu\text{g/mL}$)抗性的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后挑取阳性重组质粒, 于 5 mL LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜, 以菌液为模板, *baeR*-RF/*baeR*-RR 为引物进行 PCR 鉴定, 并将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。制备电转感受态细胞(CR Δ *baeSR* Δ *acrB*), 将重组质粒(pUC19-*baeR*)电转入 CR Δ *baeSR* Δ *acrB* 感受态细胞中, 涂布在含有氨苄西林(100 $\mu\text{g/mL}$)抗性的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑取平板上的单菌落接种于含有氨苄西林(50 $\mu\text{g/mL}$)抗性的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜, 以菌液为模板, *baeR*-RF/*baeR*-RR 为引物进行 PCR 鉴定, PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。构建成功的过表达株命名为 CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB*。

1.2.4 RT-qPCR 测定 *baeR* 表达量

以沙门氏菌 GAPDH 为内参基因, 使用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒进行总 RNA 提取, Transgen 反转录试剂盒合成 cDNA, 采用 SYBR Green I 法测定 *baeR* 的 mRNA 表达量, 数据使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 处理。

1.2.5 最小抑菌浓度测定

参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)试验操作标准, 以大肠杆菌 ATCC 25922 为质控菌株, 采用微量肉汤稀释法测定 16 种抗菌药物阿莫西

林、氨苄西林、头孢他啶、头孢噻唑、庆大霉素、大观霉素、氟苯尼考、安普霉素、黏菌素、美罗培南、乙酰甲喹、磺胺甲恶唑、磺胺异恶唑、四环素、氧氟沙星、恩诺沙星对 CR Δ *baeSR* Δ *acrB*、CR*baeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 和 CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 的 MIC 值。实验重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.6 生长曲线测定

将过夜培养物调整 OD_{600} 约为 0.2, 按照 1:100 的比例(体积比)接种于 LB 液体培养基中, 每隔 2 h 使用紫外可见分光光度计分别测定 3 株菌在 600 nm 波长处的吸光值, 共测定 12 次, 绘制生长曲线, 分析相同培养条件下 3 株菌的生长差异性。实验重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.7 生物膜形成能力测定

参照文献[13]的方法分别测定 3 株菌的生物膜形成能力。挑取 3 株菌的单菌落在 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜, 将各细菌培养物调整 OD_{600} 约为 0.2, 在无菌 96 孔细胞培养板中分别加入 200 μL 菌液, 每株菌 3 个平行, 等量的 LB 液体培养基为阴性对照。将 96 孔板置于湿盒内、37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 48 h。吸弃菌液, 每孔加 200 μL 甲醇固定 15 min, 无菌 PBS 洗涤 3 次, 自然风干; 每孔加 200 μL 0.5% 结晶紫染色 30 min, 无菌 PBS 洗涤 3 次, 自然风干; 每孔加 200 μL 乙酸溶解 30 min, 用酶标仪测 OD_{570} 值作为评价指标, 使用酶标仪测定 OD_{570} 值, 比较 CR Δ *baeSR* Δ *acrB*、CR*baeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 和 CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 这 3 株菌的生物膜形成能力。实验重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.8 运动性测定

挑取 CR Δ *baeSR* Δ *acrB*、CR*baeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 和 CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 的单菌落于 5 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 r/min 振荡培养至 OD_{600} 约为 1.0, 吸取待测菌株菌液 2 μL , 轻轻扎在

LB 半固体培养基(0.3%琼脂粉)中心打出菌液, 37 °C 正置培养 16 h, 测量菌圈直径。

1.2.9 RNA-Seq 分析及荧光定量验证

(1) 将各细菌 37 °C、180 r/min 培养至对数生长期(8 h 左右), 5 500 r/min 离心 10 min 取沉淀, 无菌 PBS 洗 3 次, 液氮速冻菌体沉淀, 于 -80 °C 冰箱保存。

(2) 使用 HiSeq 测序平台对 CR Δ *baeSR* Δ *acrB*、CR*cbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 和 CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 进行转录组测序, 由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

(3) 差异基因的本体论(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析。

通过 HTSeq 软件分析样品的基因表达水平, 比对结果使用 FPKM 法进行计算, 以 $|\text{Log}_2(\text{fold change})| > 1$ 且 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 为差异阈值筛选差异表达基因。分别将筛选到的差异表达基因导入 GO 数据库和 KEGG 数据库, 以确定差异表达基因所行使的主要生物信息学功能和参与的主要代谢通路。

(4) 从转录组中随机选取 5 个耐药基因(*pmrF*、*mdtD*、*ompW*、*fliC* 和 *sodB*)用于 RT-qPCR 分析。以沙门氏菌 GAPDH 为内参基因, 采用 SYBR Green I 法进行 mRNA 表达量分析, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 处理。

2 结果与分析

2.1 *baeR* 回补株构建结果

将 CR Δ *baeSR* Δ *acrB* 作为受体菌, *E. coli* β 2163 (*baeR*-pBAD33cm-rp4)作为供体菌进行接合试验。培养过夜后以菌液为模板, pBAD-TF/pBAD-TR 为引物进行 PCR 扩增, 筛选阳性克

隆, 片段大小为 881 bp, 见图 1, 划线纯化阳性克隆, 并将 PCR 产物送测序。测序结果表明 *baeR* 回补株构建成功。

2.2 *baeR* 过表达株构建结果

2.2.1 重组质粒的构建及转化结果

将纯化后的 *baeR* 与 pUC19 质粒同时用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, *baeR* 基因酶切片段大小约为 738 bp, 见图 2; pUC19 质粒大小约为 2 656 bp, 见图 3。酶切后的 *baeR* 与 pUC19 质粒连接后转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 构建重组质粒 pUC19-*baeR*, 用引物 *baeR*-BF/*baeR*-BR 进行 PCR 鉴定, 片段约为 750 bp, 见图 4。

2.2.2 构建 *baeR* 过表达株及其鉴定结果

将重组质粒 pUC19-*baeR* 电转入 CR Δ *baeSR* Δ *acrB* 感受态细胞, 构建 *baeR* 过表达株 CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB*, 用引物 *baeR*-BF/*baeR*-BR 进行 PCR 鉴定, 片段为 756 bp 见图 5, 测序鉴定结果正确。

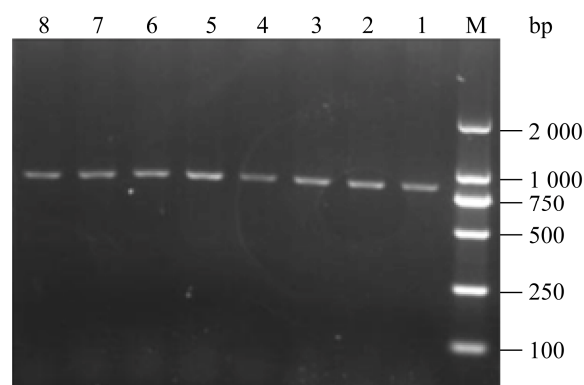


图 1 回补株检测结果 M: DL2000 DNA Marker; 1-7: 阳性克隆; 8: *E. coli* β 2163 (pBAD33cm-rp4)

Figure 1 PCR using primers pBAD-TF/pBAD-TR to test CR*cbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB*. M: DL2000 DNA Marker; 1-7: Positive clone; 8: *E. coli* β 2163 (pBAD33cm-rp4).

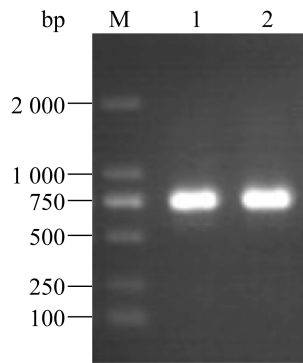


图2 *baeR* 酶切结果

Figure 2 *baeR* enzyme digestion result. M: DL2000 DNA Marker; 1–2: *baeR*.

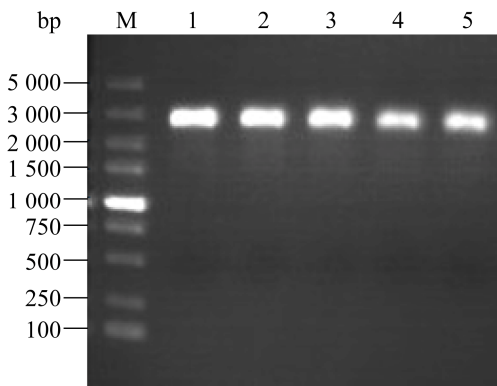


图3 pUC19 酶切结果

Figure 3 pUC19 enzyme digestion result. M: DL5000 DNA Marker; 1–5: pUC19.

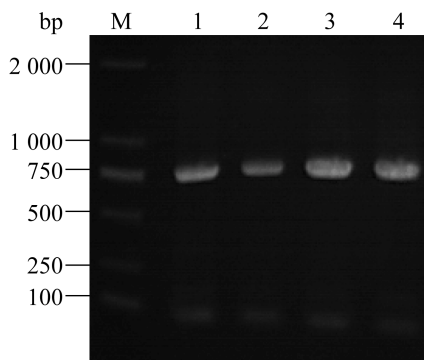


图4 重组质粒检测结果

Figure 4 PCR using primers *baeR*-BF/*baeR*-BR to test pUC19-*baeR*. M: DL2000 DNA Marker; 1–4: pUC19-*baeR*.

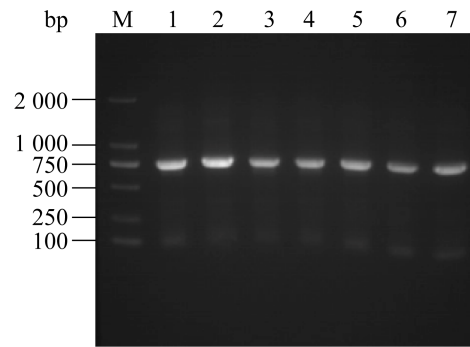


图5 过表达株检测结果

Figure 5 PCR using primers *baeR*-BF/*baeR*-BR to test CR*pbaeRΔbaeRΔacrB*. M: DL2000 DNA Marker; 1–7: Positive clone.

2.3 RT-qPCR 测定 *baeR* 表达量结果

由图6可知,与双缺失株相比,过表达株的表达量增加了1324倍,回补株增加了158倍。

2.4 抗菌药物敏感性测定结果

由表2可知,与双缺失株相比,过表达株对阿莫西林、氨苄西林、头孢他啶、头孢噻呋、氟苯尼考、乙酰甲喹、氧氟沙星、恩诺沙星的MIC分别升高256、256、16、16、4、4、2、2倍;大观霉素、安普霉素的MIC下降了50%;其他药物的MIC未发生变化。与双缺失株相比,回补株对头孢他啶、头孢噻呋、氟苯尼考、恩诺沙星的MIC分别升高了2倍,对其他药物的MIC均未发生变化。

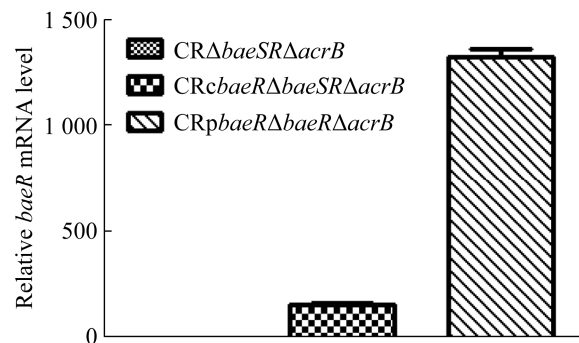


图6 *baeR* 的 RT-qPCR 验证结果

Figure 6 RT-qPCR verification results of *baeR*.

表 2 16 种临床常用药物对鼠伤寒沙门氏菌 *baeR* 过表达株的 MICTable 2 MIC of 16 commonly used clinical drugs against *Salmonella typhimurium baeR* overexpression strains ($\mu\text{g/mL}$)

菌株 Strains	CR Δ <i>baeSR</i> Δ <i>acrB</i>	CR <i>baeR</i> Δ <i>baeSR</i> Δ <i>acrB</i>	CR <i>pbaeR</i> Δ <i>baeSR</i> Δ <i>acrB</i>
阿莫西林 Amoxicillin (AMX)	0.50	0.50	128.00
氨苄西林 Ampicillin (AMP)	0.50	0.50	128.00
头孢他啶 Ceftazidime (CTD)	0.25	0.50	4.00
头孢噻吩 Ceftiofur (CEF)	0.25	0.50	4.00
美罗培南 Meropenem (IPM)	128.00	128.00	128.00
氟苯尼考 Florfenicol (FFC)	0.50	1.00	2.00
黏菌素 Colistin (COL)	1.00	1.00	1.00
庆大霉素 Gentamicin (GEN)	0.25	0.25	0.25
大观霉素 Spectinomycin (SPT)	8.00	8.00	4.00
安普霉素 Apramycin (APR)	2.00	2.00	1.00
乙酰甲喹 Methaquine (MEQ)	2.00	2.00	8.00
磺胺甲恶唑 Sulfamethoxazole (SMZ)	128.00	128.00	128.00
磺胺异恶唑 Sulfaisoxazole (SF)	128.00	128.00	128.00
四环素 Tetracycline (TET)	0.25	0.25	0.25
氧氟沙星 Ofloxacin (OFX)	4.00	4.00	8.00
恩诺沙星 Enrofloxacin (ENR)	4.00	8.00	8.00

2.5 生物学特性测定结果

2.5.1 生长特性测定结果

在相同条件下对 CR Δ *baeSR* Δ *acrB*、CR*baeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 和 CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 进行培养, 结果表明 3 株菌的生长速度无明显差异, 说明 *baeR* 的过表达对鼠伤寒沙门氏菌的生长速率无影响, 无统计学上的显著差异 ($P>0.05$), 见图 7。

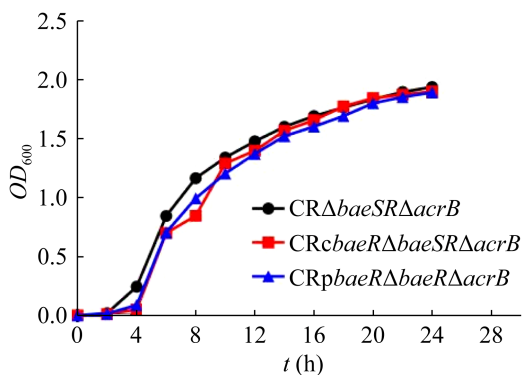


图 7 CR Δ *baeSR* Δ *acrB*、CR*baeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 和 CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 的生长曲线

Figure 7 The growth curve of CR Δ *baeSR* Δ *acrB*, CR*baeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* and CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB*.

2.5.2 生物膜形成能力测定结果

对 3 株菌的生物膜形成能力进行测定, 结果表明与 CR Δ *baeSR* Δ *acrB* 相比, CR*baeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 和 CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 的生物膜形成能力极显著升高 ($P<0.01$), 见图 8。

2.5.3 运动性测定结果

通过对 3 株菌的运动性进行测定, 测量其运动直径发现, 与 CR Δ *baeSR* Δ *acrB* 相比, CR*baeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 和 CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB* 的运动能力极显著升高 ($P<0.01$), 见图 9。

2.6 转录组学结果分析

2.6.1 基因差异表达分析

转录组学中鉴定到的差异表达基因共有 4 596 个。以 $|\text{Log}_2(\text{fold change})|>1$ 和 $P_{\text{adj}}<0.05$ 为标准筛选差异表达基因, 在 CR*baeR* Δ *baeSR* Δ *acrB*/CR Δ *baeSR* Δ *acrB* 比较组中, 共筛选到的差异表达基因有 3 073 个(下调 1 606 个, 上调 1 467 个)(图 10A); 在 CR*pbaeR* Δ *baeSR* Δ *acrB*/CR Δ *baeSR* Δ *acrB* 比较组中, 共筛选到 743 个差异表达基因(下调 19 个, 上调 724 个)(图 10B)。CR*baeR* Δ *baeSR* Δ *acrB*/

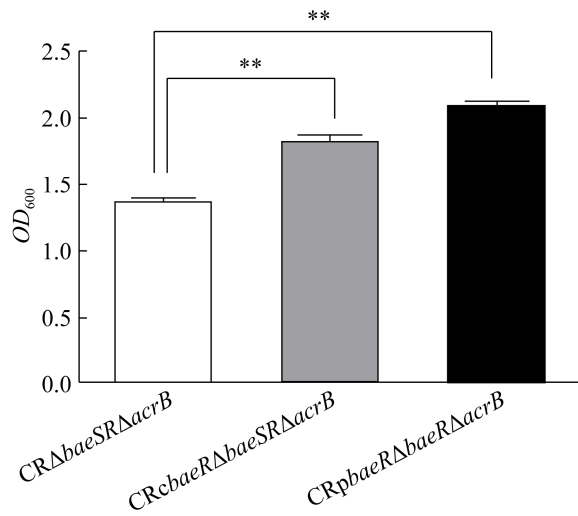


图 8 *CRΔbaeSRΔacrB*、*CRcbaeRΔbaeSRΔacrB* 和 *CRpbaeRΔbaeSRΔacrB* 的生物膜形成能力测定结果 **：与 *CRΔbaeSRΔacrB* 相比差异极显著 ($P<0.01$)

Figure 8 The biofilm forming ability of *CRΔbaeSRΔacrB*, *CRcbaeRΔbaeSRΔacrB* and *CRpbaeRΔbaeSRΔacrB*. **: The extremely significant difference compared with *CRΔbaeSRΔacrB* ($P<0.01$).

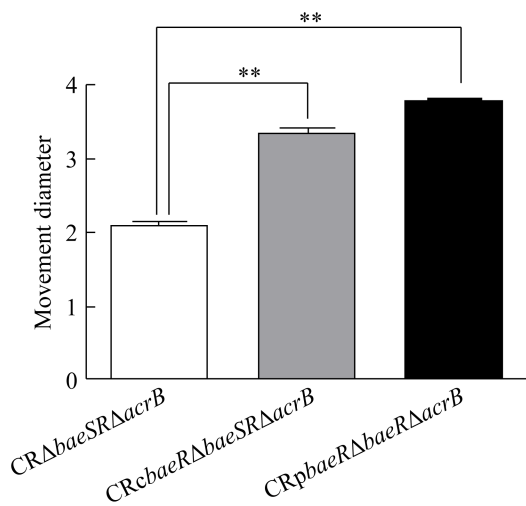


图 9 *CRΔbaeSRΔacrB*、*CRcbaeRΔbaeSRΔacrB* 和 *CRpbaeRΔbaeSRΔacrB* 的运动性测定结果 **：与 *CRΔBAESRΔACRB* 相比差异极显著 ($P<0.01$)

Figure 9 The migration assay of *CRΔbaeSRΔacrB*, *CRcbaeRΔbaeSRΔacrB* and *CRpbaeRΔbaeSRΔacrB*. **: The extremely significant difference compared with *CRΔbaeSRΔacrB* ($P<0.01$).

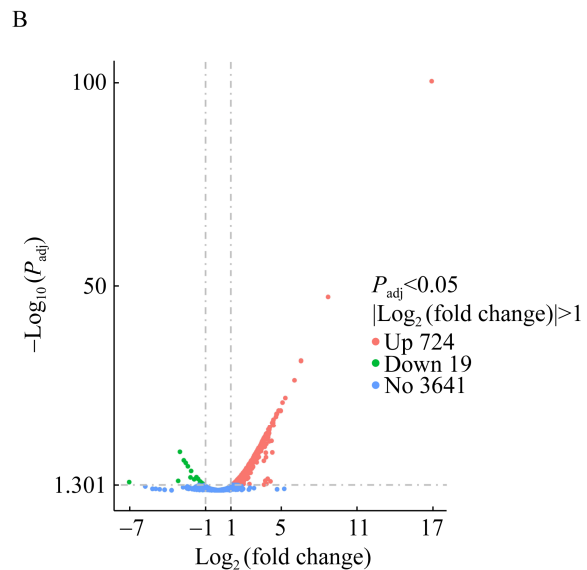
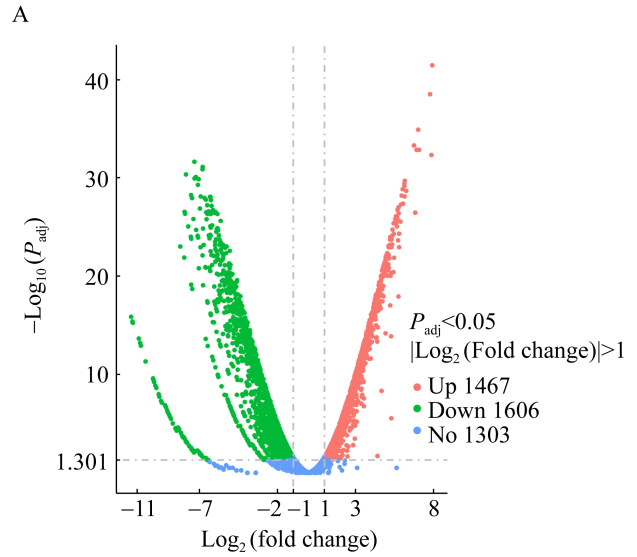


图 10 差异基因分布火山图 A: *CRcbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* 组差异表达基因数; B: *CRpbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* 组差异表达基因数量

Figure 10 Volcano map of differential gene distribution. A: Olcano plot displaying differential expressed genes between strain *CRcbaeRΔbaeSRΔacrB* and *CRΔbaeSRΔacrB*; B: Olcano plot displaying differential expressed genes between strain *CRpbaeRΔbaeSRΔacrB* *CRΔbaeSRΔacrB*.

CRΔbaeSRΔacrB 与 *CRpbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* 两组之间重叠区域共有 695 个共同差异基因(图 11)。然后对这些重叠的差异表达基因进行聚类分析, 热图中表达模式相近

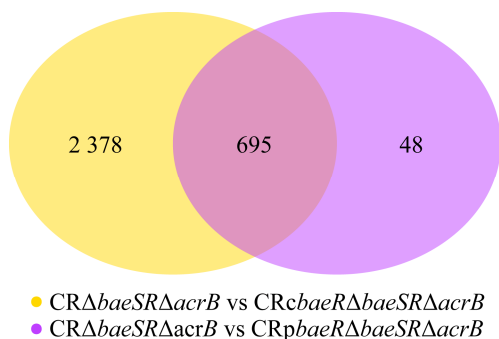


图 11 差异基因的维恩图

Figure 11 Venn diagram of differential gene.

的基因会被聚集在一起, 横向比较时, 红色表示基因高表达, 蓝色表示基因低表达(图 12)。最后从韦恩图重叠区域的共同差异表达基因中筛选 15 个耐药相关差异表达基因, 见表 3。

2.6.2 差异表达基因的 GO 富集分析和 KEGG 富集分析

GO 分析结果显示, *CRcbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* 组中差异基因主要富集在细胞内细胞器、核糖体、核糖体亚单位、核糖体结构成分和结构分子活性等方面(图 13A)。*CRpbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* 组中, 差异基因主要富集在肽生物合成、肽代谢、蛋白质合成、细胞内非膜细胞器、核糖体结构成分和结构分子活性等方面(图 13B)。

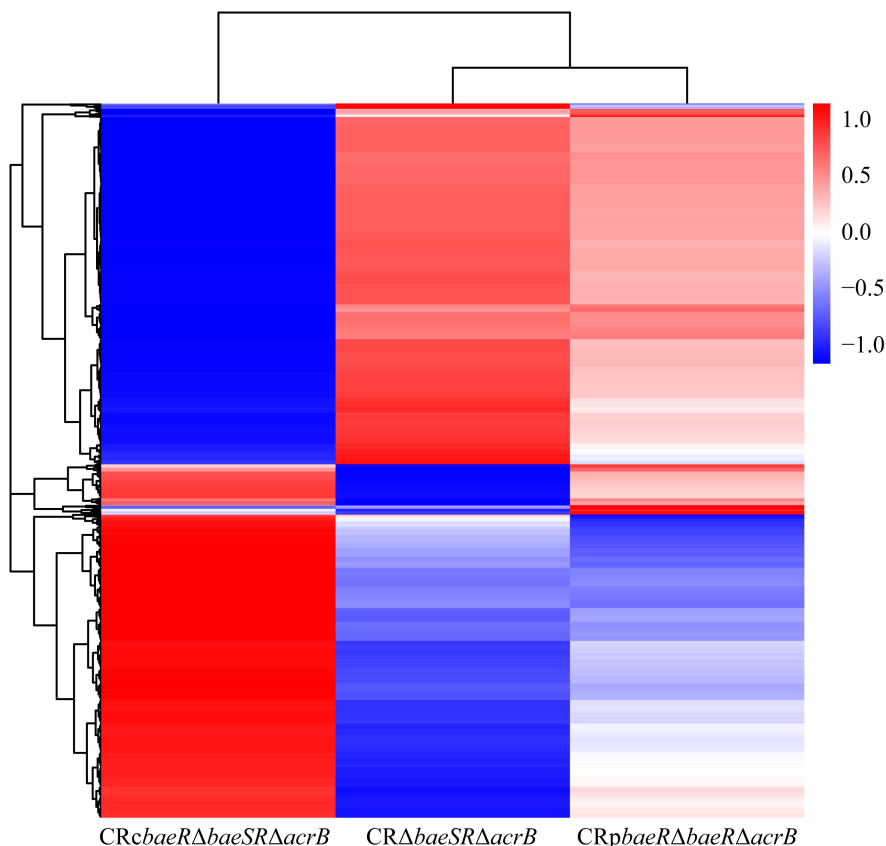


图 12 差异基因聚类热图

Figure 12 Heatmap of the clustered overlapping differential gene.

表 3 耐药相关差异表达基因

Table 3 Resistance-related differentially expressed genes

Gene name	Description	Log ₂ (fold change) >1	
		CRcbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB	CRpbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB
<i>marR</i>	Transcriptional repressor of marRAB operon	1.909 1	2.261 7
<i>marA</i>	AraC/XylS family transcriptional activator of defense systems	3.053 4	2.919 5
<i>tolC</i>	Outer membrane channel	4.302 0	4.376 1
<i>pmrD</i>	Polymyxin resistance protein B	2.534 5	1.486 2
<i>pmrF</i>	Putative glycosyl transferase	-4.878 2	0.927 0
<i>ompF</i>	Outer membrane protein F	3.895 4	-2.567 2
<i>ompC</i>	Outer membrane protein C	2.817 9	-1.5934
<i>ompW</i>	Outer membrane protein W	5.682 1	2.557 8
<i>fliC</i>	Flagellar biosynthesis flagellin	2.124 5	-2.143 5
<i>fliY</i>	Flagellar biosynthesis protein	2.660 9	1.170 1
<i>mdtD</i>	Putative MFS family transport protein	-1.818 5	1.140 7
<i>phoB</i>	Response regulator in two-component regulatory system with PhoR	1.128 7	5.091 4
<i>spy</i>	Periplasmic protein related to spheroplast formation	3.877 4	8.698 4
<i>csrB</i>	Regulatory RNA	4.281 1	3.607 8
<i>sodB</i>	Iron superoxide dismutase	6.014 7	4.271 7

KEGG 分析显示, CRcbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB 组中, 富集到 79 个信号通路的差异表达基因共 1 160 个, 其中表达量下调的差异基因 618 个, 表达量上调的差异基因 542 个, 主要富集在碳代谢、抗生素的生物合成、ABC 转运系统和次生代谢产物的生物合成等通路(图 14A)。CRpbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB 组中, 富集到 79 个信号通路的差异表达基因共 287 个, 其中表达量下调的差异基因 10 个, 表达量上调的差异基因 277 个, 主要富集在细菌分泌、β-内酰胺抗性、群体感应系统、双组分系统、TCA 循环和脂多糖的生物合成等通路(图 14B)。

2.7 RT-qPCR 验证结果

从转录组结果中随机选取 5 个差异表达基

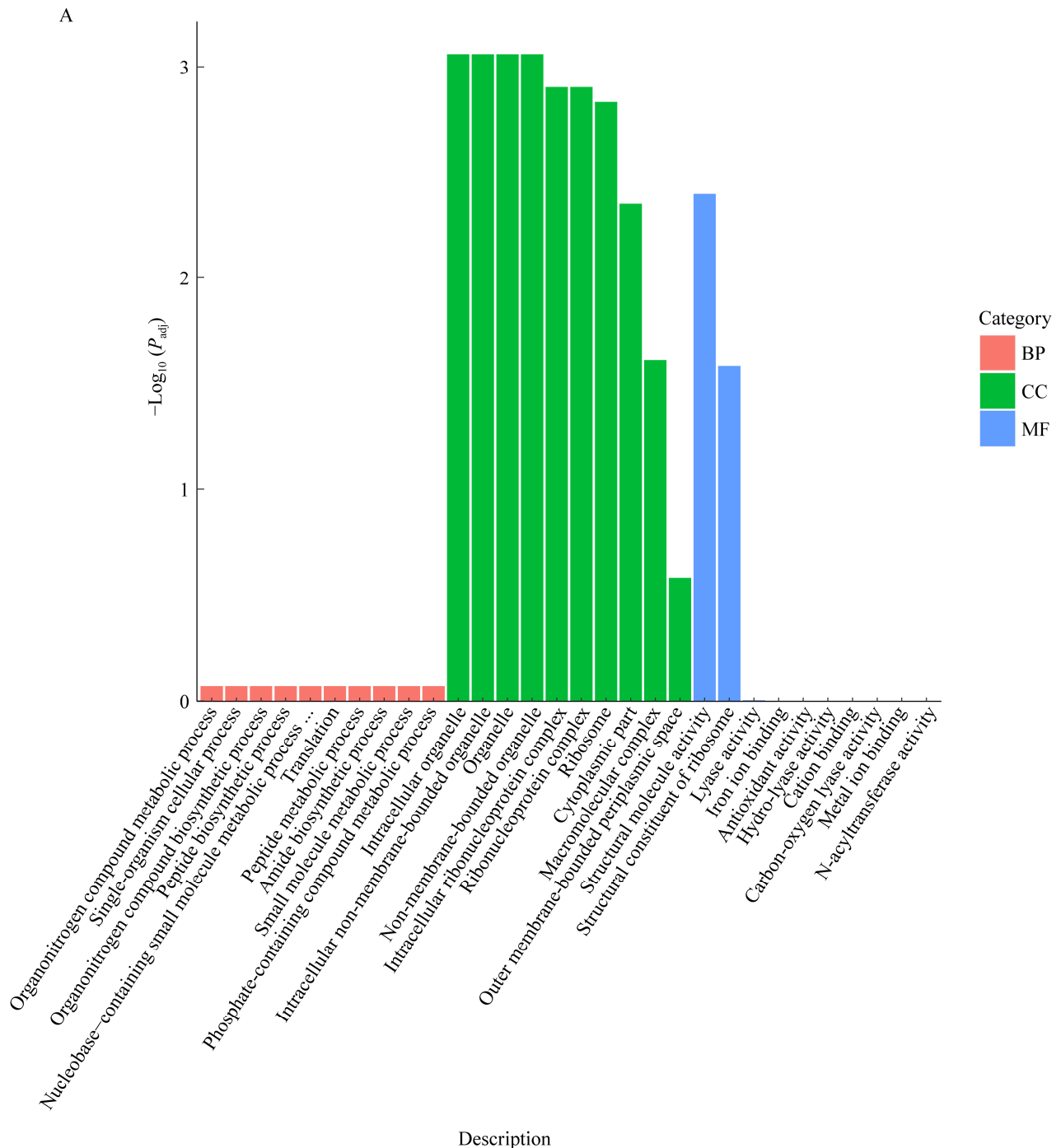
因进行 RT-qPCR 验证。结果表明选取的差异表达基因与 RNA-Seq 趋势基本一致(图 15), 证实了 RNA-Seq 分析结果的可靠性。

3 讨论与结论

沙门氏菌是一种重要的人兽共患病原菌, 其可引起动物发病, 也可通过污染动物产品引起人类发病。近年来, 沙门氏菌耐药性问题日益严重, 由于其耐药机制十分复杂, 而且多种耐药机制可协同作用, 造成高水平耐药和多重耐药(multidrug resistance, MDR)现象^[2]。为了探索 *baeSR* 在鼠伤寒沙门氏菌中与 RND 外排泵之间的调控机制, 本研究在 *baeSR* 和 *acrB* 双缺失株的基础上, 构建了 CRpbaeRΔbaeSRΔacrB 和 CRcbaeRΔbaeSRΔacrB。在本研究中, 头孢

噻唑和头孢他啶的 MIC 升高了 16 倍, Pletzer 等^[14]发现在 *acrB* 缺失的基础上过表达 *baeR*, 使得 β -内酰胺抗生素氨苄西林(>4 倍)、头孢噻唑(>4 倍)、头孢他啶(4 倍), 氯唑西林(>4 倍)和苯唑西林(>8 倍)的 MIC 升高, 本研究与其研究

基本一致。然而氨苄西林和阿莫西林的 MIC 值升高 256 倍是因为 pUC19 质粒本身带有氨苄西林抗性, 而氨苄西林与阿莫西林具有完全交叉耐药性, 所以这可能是造成阿莫西林和氨苄西林的 MIC 值高的原因。有研究表明,



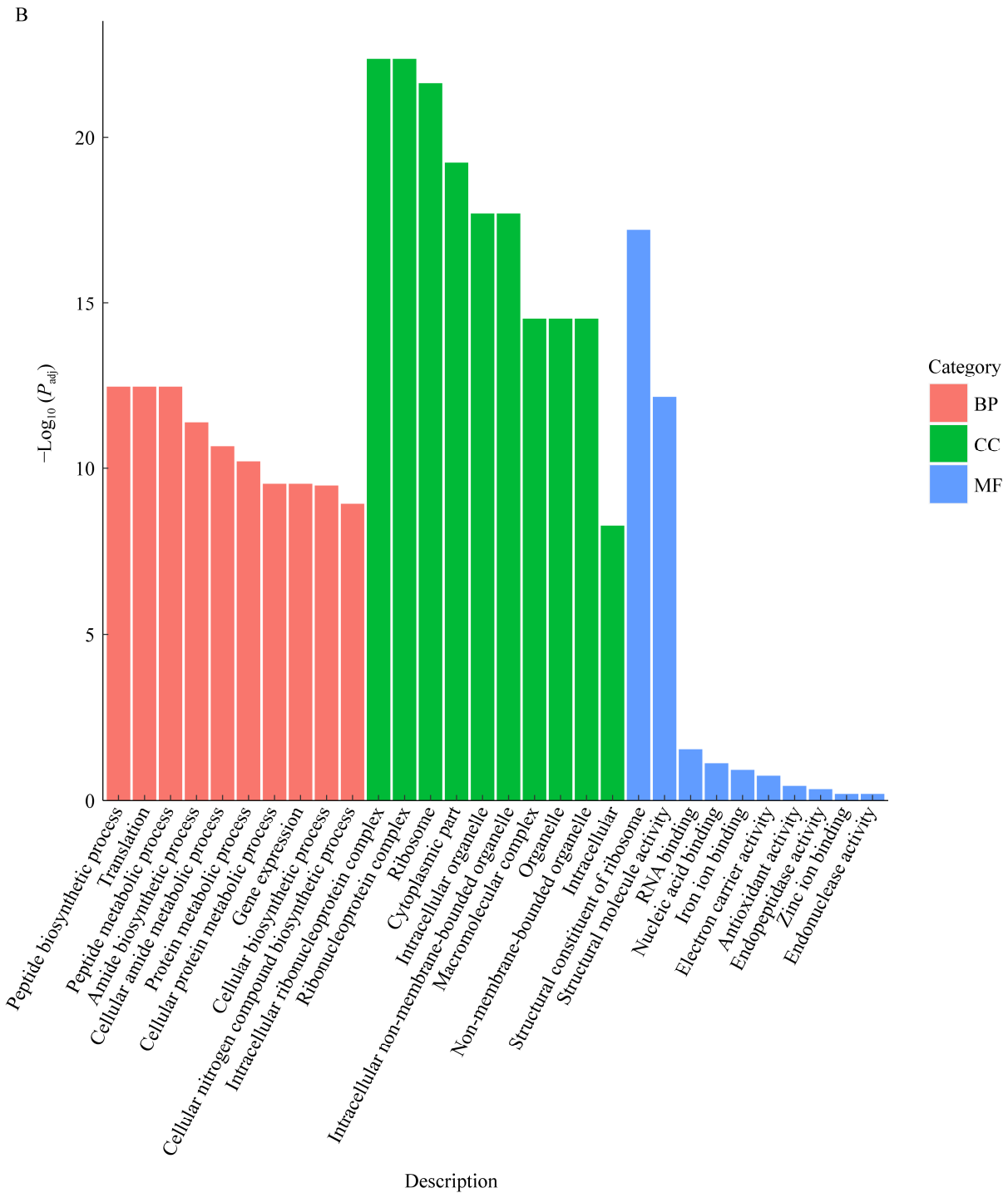
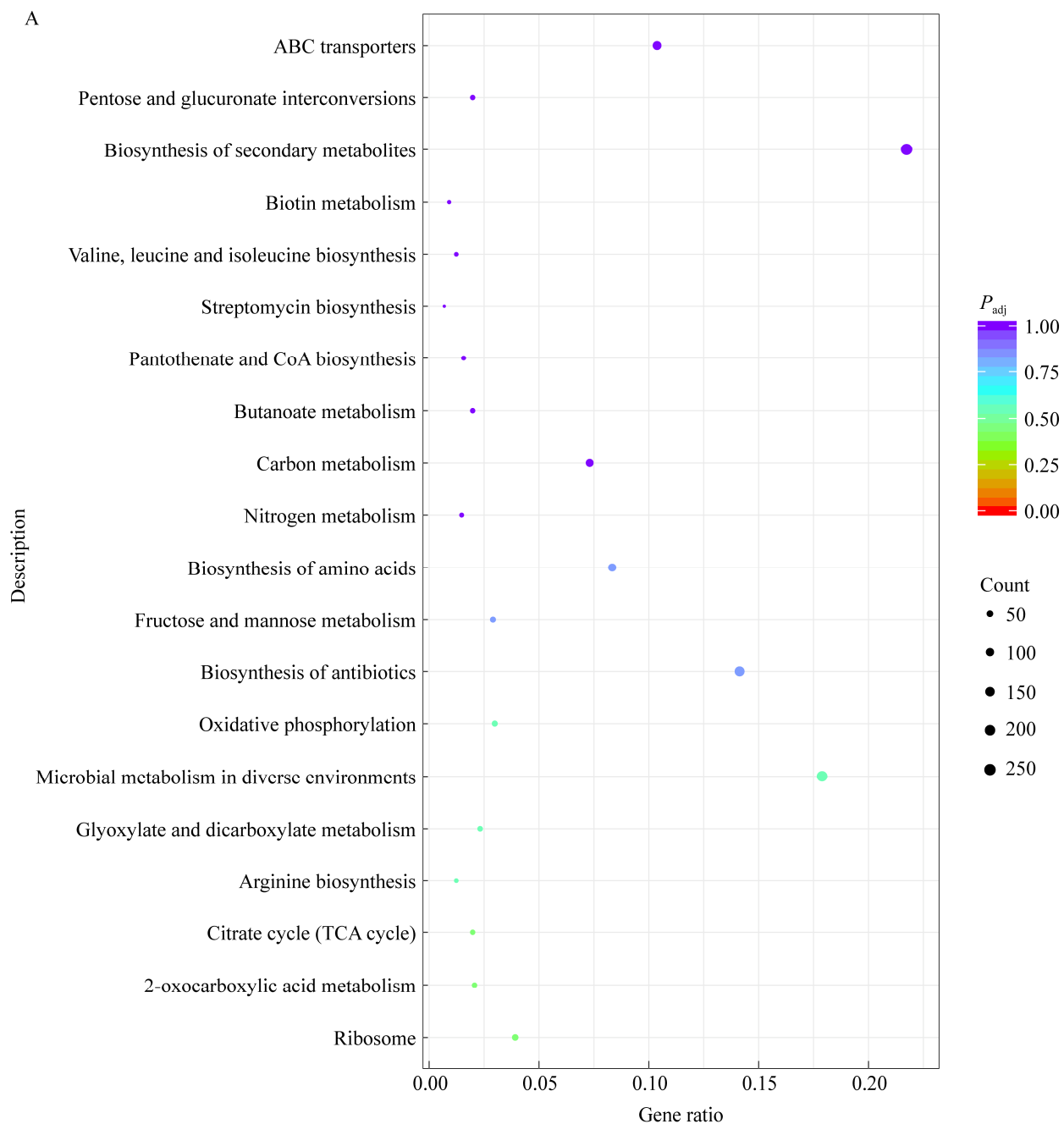


图 13 GO 功能富集 A: *CRcbaERΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* 组 GO 富集; B: *CRpbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* 组 GO 富集

Figure 13 GO feature enrichment. A: GO enrichment in *CRcbaERΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* group; B: GO enrichment in *CRpbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* group.

BaeSR 通过上调编码超氧化物歧化酶(super oxide dismutase, SOD)基因的转录水平提升了沙门氏菌对氟喹诺酮类抗生素环丙沙星的耐药性, 当 *baeSR* 缺失后 *sodA* 和 *sodB* 的 mRNA 表达水平均降低^[15]。提示氧氟沙星和恩诺沙星耐药性升

高可能是由于 *baeR* 过表达后, 上调了 *sodA* 和 *sodB* 基因的表达量, 从而增强了沙门氏菌对氟喹诺酮类抗生素的耐药性。氨基糖苷类抗生素大观霉素和安普霉素的 MIC 下降了 50%, 可能是因为与其调控的外膜蛋白的表达量有关。



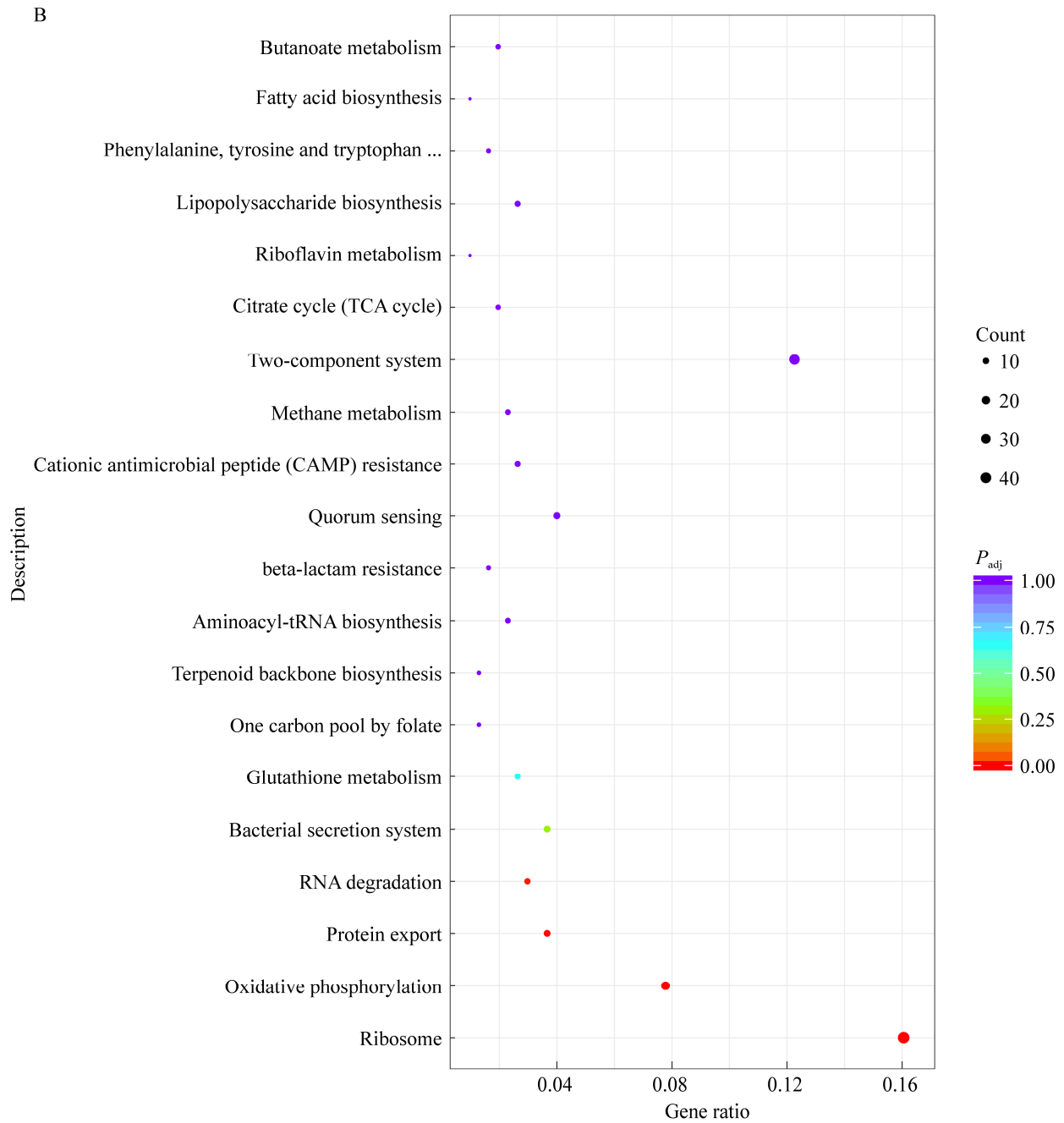


图 14 KEGG 通路富集 A : *CRcbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* 组 KEGG 富集 ; B : *CRpbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* 组 KEGG 富集

Figure 14 KEGG pathway enrichment. A: KEGG enrichment in *CRcbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* group; B: KEGG enrichment in *CRpbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* group.

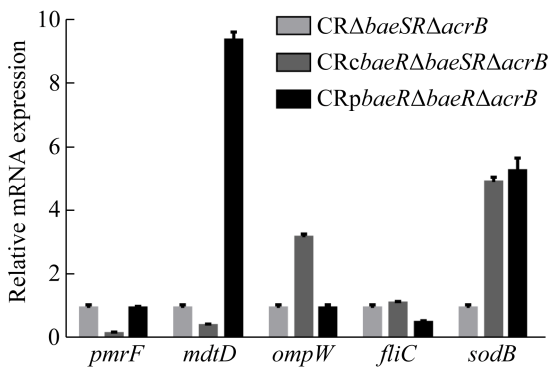


图 15 部分差异表达基因 RT-qPCR 验证结果

Figure 15 RT-qPCR verification results of the differentially expressed genes.

研究表明, 在高锌条件下缺失 *baeSR* 的沙门氏菌菌株表现出显著的生长缺陷^[16]。金属 Zn 是细胞中必要的营养物质, *baeSR* 的缺失会影响细菌中金属 Zn 的分布, 从而影响其生长性能^[17]。推测鼠伤寒沙门氏菌的生长性能需要 Zn^{2+} 和 *baeSR* 共同作用, 因此双缺失株、*baeR* 回补株和 *baeR* 过表达株的生长性能没有显著差异。生物膜(biofilm)是一种或多种微生物物种组成的菌体集合, 其存在会增强细菌对抗生素的耐药性^[18]。引起生物膜耐药的因素有很多, 主要因素是将细菌包裹在生物膜中的细胞外基质。细胞外基质主要由细胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)、细胞外 DNA 和蛋白质组成。EPS 含量减少会降低生物膜形成能力, 而 EPS 含量增加会增强生物膜形成能力。细胞外基质的数量和结构对生物膜形成的数量和结构有非常显著的影响^[19-20]。在以前的研究中, 发现 *baeR* 参与 EPS 的合成, *baeR* 的过表达增强了生物膜形成能力及解淀粉欧文氏菌的生存能力^[14]。以上研究结果均表明细菌的耐药性可能与生物膜的形成有关。因此在本研究中, 我们通过结晶紫染色法对 *baeR* 过表达前后的生物膜形成能力进行测定, 结果表明 *baeR* 的过表达显

著增强了生物膜的形成能力, 证明我们与前人的研究结果是一致的。鞭毛在生物膜形成的早期阶段起着重要作用, 并提供了生物膜形成所需的动力^[21]。鞭毛由 3 个主要部分组成, 包括细丝结构、钩复合物和具有胞质杯状结构的基体。鞭毛相关蛋白通过基体转运到细胞外部, 在那里它们被组装成螺旋钩和细丝复合物^[22-23]。细菌运动性与生物膜形成能力之间存在显著相关性。生物膜的形成高度依赖于细菌的运动性^[24]。在本研究中, 运动性变化趋势与生物膜形成趋势一致, 表明 *baeR* 通过影响鼠伤寒沙门氏菌的生物膜形成能力和运动性而影响鼠伤寒沙门氏菌的耐药性。

RNA-Seq 结果显示 *CRcbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* 组筛选到 3 073 个差异表达基因; *CRpbaeRΔbaeSRΔacrB/CRΔbaeSRΔacrB* 组筛选到 743 个差异表达基因。在两组共同变化的差异表达基因中, 共筛选到 15 个与耐药相关的基因, 其中包括外排泵相关基因 *marR*、*marA*、*mdtD* 和 *spy*; 鞭毛相关基因 *fliC* 和 *fliY*; 生物膜相关基因 *csrB* 和 *sodB*; 阳离子抗菌肽耐药相关基因 *pmrF* 和 *pmrD*; 双组分系统相关基因 *phoB* 以及外膜蛋白相关基因 *tolC*、*ompF*、*ompC* 和 *ompW*。GO 功能和 KEGG 通路结果表明与生物学表型及药敏试验结果基本一致, *baeR* 的过表达不仅使生物膜及鞭毛相关基因发生了显著性差异, 并且在双组分系统、抗生素的生物合成和 ABC 转运系统中也富集了数量较大的差异基因, 这些均与细菌耐药性有着密切联系。

革兰氏阴性细菌的主要特征是存在外膜, 该外膜可作为抑制有毒化学物质(如抗生素)渗透的附加屏障, 孔蛋白是与细胞渗透性和抗生素耐药性调节相关的外膜蛋白。BaeR 过表达增加了外膜通道 *tolC* 的表达, 这是 MdtABC 和

AcrD 多药输出系统功能所必需的^[6]。在大肠杆菌中, 当外膜蛋白 *ompF* 缺失后对 β -内酰胺类、氟喹诺酮类、酰胺醇类等多种抗生素具有抗性, 表明 *ompF* 是许多抗生素外膜渗透的主要途径^[7]。在沙门氏菌中, 外膜蛋白 *ompF* 的表达水平降低, 增强了沙门氏菌对环丙沙星的耐药性, 这可能也是引起高水平喹诺酮耐药性的原因^[25]。提示外膜蛋白 *ompW* 可能与氨基糖苷类抗生素耐药性有关。在本研究中, *baeR* 过表达后, 多种抗生素耐药性升高可能是由于膜孔蛋白 *ompF* 和 *ompC* 的表达量下降导致膜孔通透性下降、转运药物能力降低引起的。然而, 安普霉素和庆大霉素耐药性下降的原因可能是由于 *ompW* 表达量升高, 降低了生物膜的形成能力从而提高菌株对氨基糖苷类抗生素的敏感性。有研究表明, 菌株群体泳动能力与生物膜形成能力显著正相关性^[26]。细菌运动受到鞭毛控制, *fliY* 不仅介导细菌的运动, 还参与调节鞭毛的合成^[23]。除去鞭毛基因后, 形成生物膜的细菌数量明显减少, 这表明鞭毛在形成生物膜的结构中起着重要的作用^[27]。有研究表明 *csrB* 与生物膜显著相关, 可以抑制生物膜的形成^[28]。*sodB* 基因的缺失会增强生物膜形成能力^[29]。在本研究中, 鞭毛相关基因 *fliY* 和生物膜相关基因 *csrB*、*sodB* 表达量均升高, 与前人研究结果基本一致。提示 *baeR* 可能通过影响鼠伤寒沙门氏菌的生物膜形成能力及运动性而影响其耐药性。PhoB 属于 PhoRB 双组分系统, 参与环境中磷酸盐的调节, 有研究表明 BaeSR、PhoBR 和 CreBC 双组分系统之间存在交叉调节, *baeR* 过表达后激活的基因包括麦芽糖转运、趋化反应和鞭毛生物合成的基因, 都需要完整的 PhoBR 或 CreBC 双组分系统进行正调节^[6]。*pmrF*、*pmrD* 都是与多黏菌素耐药相关的基因, PhoPQ 和 PmrAB 双组

分系统主要通过激活 PmrF 操纵子的表达从而引起肺炎克雷伯菌对黏菌素耐药。同时 PhoPQ 也可以通过连接蛋白 PmrD 交叉激活 PmrAB^[30]。

综上所述, *baeR* 过表达后通过调控生物膜形成及运动性从而介导鼠伤寒沙门氏菌对多种药物的耐药性。转录组学测序结果显示, 15 个耐药相关基因显著差异表达, 表明 *baeR* 过表达后可通过调节外排泵、生物膜和鞭毛等相关基因的表达影响鼠伤寒沙门氏菌的耐药性。

REFERENCES

- [1] Wójcicki M, Świder O, Daniluk KJ, Średnicka P, Akimowicz M, Roszko ML, Sokołowska B, Juszczyk-Kubiak E. Transcriptional regulation of the multiple resistance mechanisms in *Salmonella*: a review[J]. Pathogens, 2021, 10(7): 801
- [2] Tiwari S, Jamal SB, Hassan SS, Carvalho PVSD, Almeida S, Barh D, Ghosh P, Silva A, Castro TLP, Azevedo V. Two-component signal transduction systems of pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy: an overview[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1878
- [3] Raffa RG, Raivio TL. A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 2002, 45(6): 1599-1611
- [4] Lin MF, Lin YY, Yeh HW, Lan CY. Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii adeAB* genes and its correlation with tigecycline susceptibility[J]. BMC Microbiology, 2014, 14: 119
- [5] Leblanc SKD, Oates CW, Raivio TL. Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(13): 3367-3375
- [6] Nishino K, Honda T, Yamaguchi A. Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(5): 1763-1772
- [7] Wang SY, You CB, Memon FQ, Zhang GY, Sun YW, Si HB. *BaeR* participates in cephalosporins susceptibility by regulating the expression level of outer membrane proteins in *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biochemistry, 2021, 169(1): 101-108
- [8] Lin MF, Lin YY, Lan CY. The role of the

- two-component system BaeSR in disposing chemicals through regulating transporter systems in *Acinetobacter baumannii*[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132843
- [9] Salehi B, Ghalavand Z, Yadegar A, Eslami G. Characteristics and diversity of mutations in regulatory genes of resistance-nodulation-cell division efflux pumps in association with drug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2021, 10(1): 53
- [10] Hu WS, Chen HW, Zhang RY, Huang CY, Shen CF. The expression levels of outer membrane proteins STM1530 and OmpD, which are influenced by the CpxAR and BaeSR two-component systems, play important roles in the ceftriaxone resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(8): 3829-3837
- [11] 王文静. 双组分系统 BaeSR 对鼠伤寒沙门氏菌耐药性的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2019
Wang WJ. Effects of the two-component system BaeSR on the antibiotic resistance of *Salmonella typhimurium*[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [12] 徐军. 双组分系统 BaeSR 和外排泵 AcrB 调控鼠伤寒沙门氏菌耐药性的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2020
Xu J. Study on the resistance regulation of the two-component system BaeSR and efflux pump AcrB to *Salmonella typhimurium*[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [13] Chakroun I, Mahdhi A, Morcillo P, Cordero H, Cuesta A, Bakhruf A, Mahdouani K, Esteban MÁ. Motility, biofilm formation, apoptotic effect and virulence gene expression of atypical *Salmonella* Typhimurium outside and inside Caco-2 cells[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 114: 153-162
- [14] Pletzer D, Stahl A, Oja AE, Weingart H. Role of the cell envelope stress regulators *BaeR* and *CpxR* in control of RND-type multidrug efflux pumps and transcriptional cross talk with exopolysaccharide synthesis in *Erwinia amylovora*[J]. Archives of Microbiology, 2015, 197(6): 761-772
- [15] Guerrero P, Collao B, Álvarez R, Salinas H, Morales EH, Calderón IL, Saavedra CP, Gil F. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium BaeSR two-component system positively regulates *sodA* in response to ciprofloxacin[J]. Microbiology, 2013, 159(Pt_10): 2049-2057
- [16] Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(24): 9066-9075
- [17] Wang D, Fierke CA. The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli*[J]. Metallomics, 2013, 5(4): 372-383
- [18] 孙长龙, 吴思, 张倩楠, 马信, 齐笑莹, 张阳. 基于群体感应调控细菌生物膜形成研究进展[J]. 山东化工, 2021, 50(2): 89-91
Sun CL, Wu S, Zhang QN, Ma X, Qi XX, Zhang Y. Advances in the regulation of bacterial biofilm formation based on quorum Sensing[J]. Shandong Chemical Industry, 2021, 50(2): 89-91 (in Chinese)
- [19] Ashrafudoulla M, Mizan MFR, Ha AJW, Park SH, Ha SD. Antibacterial and antibiofilm mechanism of eugenol against antibiotic resistance *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103500
- [20] Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial biofilm eradication agents: a current review[J]. Frontiers in Chemistry, 2019, 7: 824
- [21] Wolska KI, Grudniak AM, Rudnicka Z, Markowska K. Genetic control of bacterial biofilms[J]. Journal of Applied Genetics, 2016, 57(2): 225-238
- [22] Schuhmacher JS, Thormann KM, Bange G. How bacteria maintain location and number of flagella?[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2015, 39(6): 812-822
- [23] Cheng CY, Wang H, Ma TT, Han X, Yang YC, Sun J, Chen ZW, Yu HF, Hang Y, Liu FD, et al. Flagellar basal body structural proteins FlhB, FlhM, and FlhY are required for flagellar-associated protein expression in *Listeria monocytogenes*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 208
- [24] Li YL, Xia HM, Bai F, Song XY, Zhuang LN, Xu HJ, Zhang XM, Zhang XM, Qiao MQ. *PA5001* gene involves in swimming motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 144: 103982
- [25] Choi U, Lee CR. Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 953
- [26] 吴丽娜, 董鹏程, 张一敏, 毛衍伟, 梁荣蓉, 杨啸吟, 朱立贤, 罗欣. 大肠杆菌 O157:H7 在不锈钢表面生物膜形成能力及其与菌株的特性关系[J]. 食品科学, 2020, 41(22): 127-132
Wu LN, Dong PC, Zhang YM, Mao YW, Liang RR, Yang XY, Zhu LX, Luo X. Biofilm formation ability of *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel surface and its relationship with bacterial characteristics[J]. Food Science, 2020, 41(22): 127-132 (in Chinese)

- [27] Wang FY, Deng L, Huang FF, Wang ZF, Lu QJ, Xu CR. Flagellar motility is critical for *Salmonella enterica* serovar typhimurium biofilm development[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1695
- [28] Schachterle JK, Stewart RM, Schachterle MB, Calder JT, Kang H, Prince JT, Erickson DL. *Yersinia pseudotuberculosis* BarA-UvrY two-component regulatory system represses biofilms via *CsrB*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 323
- [29] 陈妍妍. 溶藻弧菌定植因子 *AcfA* 的功能及其对 *SOD*、*Flg* 和 *Dct* 的调控[D]. 湛江: 广东海洋大学博士学位论文, 2019
- Chen YY. Study on the function and regulation of accessory colonization factor *AcfA* of *Vibrio alginolyticus* to *SOD*, *Flg* and *Dct*[D]. Zhanjiang: Doctoral Dissertation of Guangdong Ocean University, 2019 (in Chinese)
- [30] Cheung CHP, Dulyayangkul P, Heesom KJ, Avison MB. Proteomic investigation of the signal transduction pathways controlling colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.05.05.078428

2022 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	活动名称	主要主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	第 23 次全国环境微生物学术研讨会	环境微生物学专业委员会	1 月 8-11 日	400	天津	马挺 13902089678
2	大亚湾生物安全培训	微生物生物安全专业委员会	3 月 14-20 日	500	广东深圳	贾晓娟 18600189362
3	2022 水产减抗高效养殖(国际农业产业园)论坛	微生物资源专业委员会	3 月	100	河北廊坊	李道君, 周志刚 15964394630, 18611531383
4	第四届合成微生物学与生物制造学术研讨会	分子微生物学及生物工程专业委员会	3-4 月	200	广东广州	刘建忠 13922453898
5	青年微生物学工作者学术研讨会	普通微生物学专业委员会	4 月 23-24 日	300	山东青岛	李盛英 15066181927
6	第五届全国病毒学青年学者学术研讨会	病毒学专业委员会	4 月(暂定)	200-300	广东深圳	吴莹 15901455682
7	第十届全国地质微生物学专业研讨会	地质微生物学专业委员会	5 月 27-29 日	600	广西桂林	夏源 18977320423
8	第十七届全国芽胞杆菌青年工作者学术研讨会	农业微生物学专业委员会	5 月中旬	200	北京	张杰 zhangjie05@caas.cn
9	生物安全论坛	微生物生物安全专业委员会	6 月中旬	100	山东济南	贾晓娟 18600189362
10	《中国微生物学会第八届全国农业微生物研究及产业化研讨会》暨《第十七届全国杀虫微生物学学术研讨会》	农业微生物学专业委员会	7 月	200	广东广州	杨凯 yangkai@mail.sysu.edu.cn
11	儿科临床病毒学论坛	病毒学专业委员会	7 月 9 日	200	北京	吴莹 15901455682
12	第十二届兽医微生物学专业委员会学术报告会	兽医微生物学专业委员会	8 月	200	吉林长春	冯宇, 朱良全 010-62106555, 010-61255325
13	第二届全国根际微生物学术研讨会	农业微生物学专业委员会	8 月	300	江苏南京	张瑞福 18705198006
14	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会 2022 年学术研讨会	海洋微生物学专业委员会	8 月	100	山东青岛	张玉忠, 张熙颖 0532-58632590
15	第十三届全国微生物资源学术研讨会	微生物资源专业委员会	8 月	400	湖北武汉	彭楠, 阮志勇 18062795566, 13301101231