



金属离子抑制细菌整合子捕获耐药基因盒的机制研究

郝佳慧¹, 杨泽华^{2*}

1 山西医科大学第一临床医学院, 山西 太原 030001

2 山西医科大学第一医院检验科, 山西 太原 030001

郝佳慧, 杨泽华. 金属离子抑制细菌整合子捕获耐药基因盒的机制研究. 微生物学报, 2022, 62(10): 3957–3970.

Hao Jiahui, Yang Zehua. Mechanism of metal ions against capturing drug resistance gene cassette by bacterial integron. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3957–3970.

摘要: 【目的】探索金属离子对整合子捕获耐药基因盒的影响及其相关机制。【方法】在大肠埃希菌中构建一个 1 类整合子捕获耐药基因盒的体内模型。通过实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)测定不同浓度银(0.3、0.9、1.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 Ag^+)和铜离子(5、50、100、150、210 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cu^{2+})干预后实验组和无金属离子干预对照组整合子整合频率, 并用表型筛选法验证。利用质谱法测量细菌吸收的金属离子浓度, 并进一步通过转录组测序方法分析银离子抑制细菌整合子捕获耐药基因盒的分子机制。【结果】qPCR 和表型筛选法的结果表明, 0.9 $\mu\text{g/mL}$ 银离子组整合频率为 9.42×10^{-5} (6.49×10^{-5} , 1.44×10^{-4}), 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 银离子组整合频率为 7.29×10^{-5} (4.45×10^{-5} , 9.03×10^{-5}), 与对照组 2.59×10^{-4} (2.24×10^{-4} , 3.33×10^{-4})相比整合频率明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。而不同浓度铜离子组与对照组没有明显差异。转录组测序方法对银离子作用前后大肠杆菌基因表达水平进行对比分析, 通过 GO 功能和 KEGG 通路富集发现, 差异表达基因与甲基半乳糖苷转运(methylgalactoside transport)、麦芽糖转运(maltose transport)、磷酸烯醇式丙酮酸-甘油磷酸转移酶活性(phosphoenolpyruvate-glycerone phosphotransferase activity)和甘油激酶活性(glycerone kinase activity)等功能有关以及涉及氨基酸糖和核苷酸糖代谢(amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、鞭毛组装(flagellar assembly)、阳离子抗菌肽(CAMP)耐药性[cationic antimicrobial peptide (CAMP) resistance]、果糖和甘露糖代谢和磷酸糖转移酶系统[phosphotransferase system (PTS)]等代谢通路。通过蛋白互作网络筛选出前 12 个枢纽基因(*ptsG*、*malE*、*lamB*、*lacZ*、*malK*、*basR*、*ais*、*ugd*、*nagE*、*metN*、*malQ* 和 *malF*)。【结论】一定浓度银离子可以抑制整合子整合耐药基因盒。铜离子对整合频率影响不明显, 因此不是所有具有杀菌性

*Corresponding author. E-mail: zehuay026@163.com

Received: 22 February 2022; Revised: 14 April 2022; Published online: 10 June 2022

的金属离子都能对整合频率产生影响。银离子抑制细菌整合子捕获耐药基因盒可能是通过影响麦芽糖转运和碳分解代谢来调控。然而，碳分解代谢和麦芽糖转运过程很复杂，需要进一步研究。目前尚无细菌整合子转录组学相关研究，这为解决细菌耐药性问题提供了一个新的途径。

关键词：金属；整合子；基因盒；耐药；转录组测序

Mechanism of metal ions against capturing drug resistance gene cassette by bacterial integron

HAO Jiahui¹, YANG Zehua^{2*}

1 First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

2 Department of Clinical Laboratory, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

Abstract: [Objective] To explore the effect of metal ions against capturing drug resistance gene cassette by integron and the related mechanism. [Methods] An *in vivo* model of class 1 integron capturing resistance gene cassette was constructed in *Escherichia coli*. Different concentration of silver ions (0.3, 0.9, and 1.5 $\mu\text{g/mL}$ of Ag^+) and copper ions (5, 50, 100, 150, and 210 $\mu\text{g/mL}$ of Cu^{2+}) were used to intervene in the experimental group. The integration frequency of the experimental group and the control group was determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and validated by phenotypic screening. The concentration of metal ions absorbed by bacteria was measured by mass spectrometry, and the molecular mechanism of silver ion against capturing drug resistance gene cassette by bacterial integron was further analyzed by transcriptome sequencing. [Results] The integration frequencies were 9.42×10^{-5} (6.49×10^{-5} , 1.44×10^{-4}) in the 0.9 $\mu\text{g/mL}$ silver ion group and 7.29×10^{-5} (4.45×10^{-5} , 9.03×10^{-5}) in the 1.5 $\mu\text{g/mL}$ silver ion group, which were lower than the 2.59×10^{-4} (2.24×10^{-4} , 3.33×10^{-4}) in the control group ($P < 0.001$). In contrast, there was no significant difference between the groups with different concentration of copper ions and the control group. The gene expression level of *E. coli* before and after silver ion treatment was compared and analyzed by transcriptome sequencing. The differentially expressed genes were related to the Gene Ontology (GO) terms of methylgalactoside transport, maltose transport, phosphoenolpyruvate-glycerone phosphotransferase activity, and glycerone kinase activity, and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways of amino sugar and nucleotide sugar metabolism, flagellum assembly, cationic antimicrobial peptide (CAMP) resistance, fructose and mannose metabolism, and phosphotransferase system (PTS). The top 12 hub genes (*ptsG*, *malE*, *lamB*, *lacZ*, *malK*, *basR*, *ais*, *ugd*, *nagE*, *metN*, *malQ* and *malF*) were screened out by protein-protein interaction (PPI) network. [Conclusion] A certain concentration of silver ions inhibited the integration of drug resistance gene cassettes by integron, while the effect of copper ions was not obvious. Therefore, not all metal ions with bactericidal properties had the effect on integration frequency. The mechanism of silver ions against capturing drug resistance gene cassette by bacterial integron was possibly through maltose transport and carbon catabolism. However, the processes of carbon catabolism

and maltose transport were complex and deserved further study. At present, there is no related study on bacterial integron transcriptome. This study provides a new way to solve the problem of bacterial drug resistance.

Keywords: metal; integron; gene cassette; drug resistance; transcriptome sequencing

抗生素自 20 世纪被发现以来, 一直被认为是治疗许多不同疾病的灵丹妙药, 给临床疾病带来了好的治疗效果。然而, 在水产养殖业和畜牧业, 抗生素大多不是用来治疗疾病, 而是用来促进生长和预防疾病, 导致抗生素的滥用, 从而引起细菌对抗生素耐药性增强^[1-2]。细菌可以通过基因突变和水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)获得抗生素耐药性^[3]。整合子捕获耐药基因盒是细菌耐药基因传播的一个关键机制。其具有独特的结构, 可以捕获和表达外来基因, 并可以通过转座子和质粒在细菌之间横向传播。所有整合子都有 3 个基本组成部分, 包括整合酶基因(*intI*)、重组位点(*attI*)和启动子(*Pc*)^[4]。在环境选择压力下, 整合酶基因编码的整合酶蛋白切除并整合具有不同功能的基因盒, 并且将基因盒插入重组位点 *attI*。启动子 *Pc* 启动基因盒的转录和随后的表达, 使细菌获得了适应不断变化环境的能力。抗菌药物耐药性(antimicrobial resistance, AMR)是暴露于大量抗生素的细菌进化的结果^[5]。目前, 全球对整合子的研究主要集中在其捕获、切除和表达基因盒的调控机制方面。尽管研究发现启动子、SOS 反应、重组位点等因素对整合子的捕获、切除和表达耐药基因盒有一定影响, 但具体的调控机制仍不清楚^[6-7]。整合子如何传播耐药基因是迫切需要解决的问题, 对防止耐药性产生具有指导意义。

随着细菌耐药性问题越来越严重, 甚至出现了耐多药的“超级细菌”^[8-9], 需要研发新型抗菌剂。金属离子自古以来, 就被作为对付细菌

的有力武器。大约 500 年前中国的传统医药书目《本草纲目》中就有记载, 银片(碎屑)具有一定的药用价值。使用金属抗菌剂以应对目前的抗菌素耐药性危机引起研究人员极大兴趣。本课题组研究了金属离子对基因改造后携带整合子系统的大肠杆菌中的整合子捕获基因盒的影响, 并从多个层面探讨其相关机制。转录组学研究是近年来分子生物学的热门, 而转录组测序是其核心技术。转录组测序的应用在基因表达水平分析和差异表达分析、新基因的挖掘、寻找单核苷酸多态性及应用、基因功能注释等都有所体现^[10]。目前尚无细菌整合子转录组学相关研究。本研究通过转录组测序的方法对银离子作用后细菌整合子整合频率发生改变的大肠杆菌进行分析, 探究银离子抑制细菌整合子捕获基因盒的作用机制。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂和仪器

本研究中使用的化学试剂胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、琼脂、氨苄西林(ampicillin, AMP)、链霉素均购自上海源叶生物科技有限公司。甲氧苄胺嘧啶(trimethoprim, TMP)购自厦门科研生物技术有限公司。细菌培养液中添加的重金属为硝酸银(AgNO_3)和硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 分别购自上海精科化学试剂有限公司和天津博迪化学有限公司。qPCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, 质粒提取试剂盒购自艾美捷科技有限公司。采用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪扩增待测物, 金属离子测量时使用

iCAPQ 电感耦合等离子体质谱仪。

1.2 细菌菌株、质粒和培养基

本研究中使用的细菌菌株和质粒是由本实验室保存的，见表 1，具体的制备方法见文献 [11]。将质粒 pUCINT 和 pACINAD (图 1)转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中(命名为 HS2)，构建具有高表达整合酶整合子捕获基因盒体内模型。LB 液体培养基是由 1%胰蛋白酶、0.5%酵母提取物和 1%氯化钠配制的。固体培养基是在 LB 液体培养基中添加 1.5%的琼脂制成的。

1.3 细菌的培养

取 40 μL HS2 菌液接种在 20 mL LB 培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 24 h。为防止污染，培养基中加入 TMP 和 AMP，工作液浓度分别为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。初步实验在培养基中加入 Ag^+ 浓度大于 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或者 Cu^{2+} 浓度大于 210 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，几乎未见细菌生长。实验组分别在培养基中添加不同浓度金属离子。金属离子(即 Ag^+ 、 Cu^{2+})通过使用 AgNO_3 和 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 按以下浓度加入培养基中：(1) 0.3、0.9 和

表 1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Relevant properties
Plasmids	
pUCINT	The integron integrase <i>intI1</i> gene cloned between <i>EcoR</i> I and <i>Pst</i> I sites of pUC19
pACIN	The integron gene cloned between <i>Sca</i> I and <i>Nco</i> I sites of pACYC184
pACADA	The <i>aadA2</i> gene cassette cloned between <i>EcoR</i> V and <i>Cla</i> I sites of pACYC184
pACINAD	The integron gene and <i>aadA2</i> gene cassette cloned into between <i>Sca</i> I and <i>Nco</i> I and <i>EcoR</i> V and <i>Cla</i> I restriction sites of pACYC184, respectively
<i>E. coli</i>	
HS2	pUCINT and pACINAD were transformed into <i>E. coli</i> BL21(DE3)

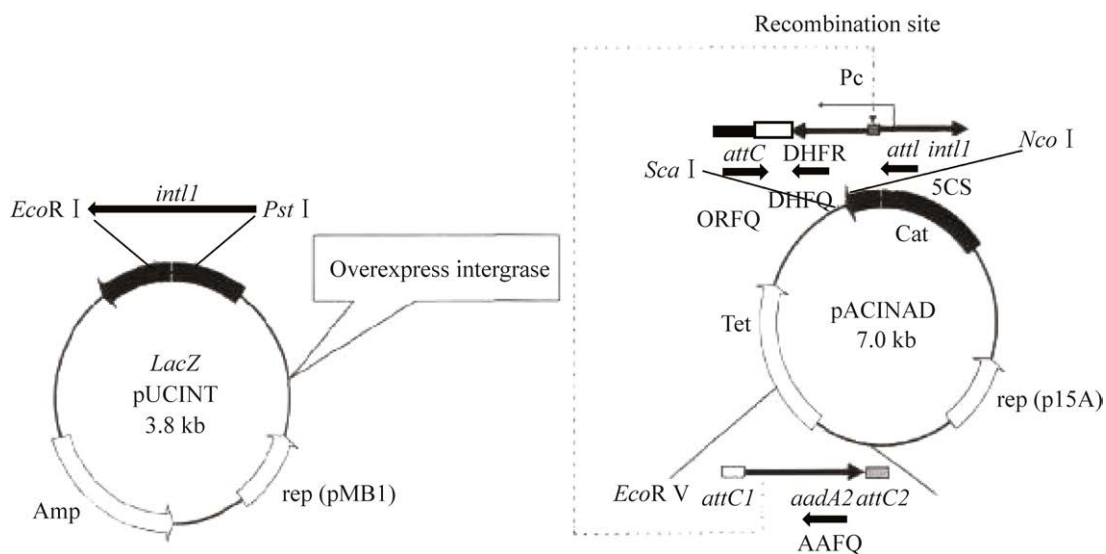


图 1 重组质粒 pUCINT 和 pACINAD

Figure 1 Recombinant plasmids pUCINT and pACINAD.

1.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 Ag^+ ; (2) 5、50、100、150、210 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cu^{2+} 。在 AgNO_3 加入到培养基中后, 需要避光培养。对照组不添加任何金属离子, 培养方式同上。

1.4 qPCR 检测整合子的整合频率

1.4.1 建立标准曲线

建立总整合子标准曲线。根据质粒提取试剂盒的说明书, 从培养过夜的菌株中提取质粒 pACIN。测量 260 nm 和 280 nm 处质粒的吸光度, 确定最终提取产物的浓度和纯度。定量后, 通过其相对分子质量计算拷贝数, 并将其稀释成 10 倍的连续稀释系列, 作为 qPCR 检测的模板。qPCR 反应体系包括 1 μL 模板, 正向和反向引物各 0.2 μL , 5 μL SYBR Premix Ex Taq 和 3.6 μL 去离子水。引物序列见表 2^[11]。引物由上海赛百盛公司合成。qPCR 反应条件为: 95 $^\circ\text{C}$ 10 s; 95 $^\circ\text{C}$ 5 s, 58 $^\circ\text{C}$ 8 s, 72 $^\circ\text{C}$ 27 s, 40 个循环。通过测得的 $C_t(y)$ 与标准质粒拷贝数(x)的对数的回归分析得到标准曲线方程。同时, 根据上述相同的方法, 从培养过夜的菌株中提取 pACADA, 构建发生整合的整合子的标准曲线。

1.4.2 用煮沸法提取对照组和实验组的 HS2 的 DNA 作为 PCR 模板

取 2 mL 培养后的菌液, 用 1 mL 去离子水洗涤 2 次, 然后加入 200 μL 去离子水充分悬浮, 在 100 $^\circ\text{C}$ 沸水中煮沸 10 min, 10 000 $\times g$ 离心 3 min, 吸取 1 μL 上清液作为模板。如前所述, 进行 qPCR, 反应条件和反应体系与构建标准曲线时一致。测定 HS2 总整合子拷贝数的 PCR 产

物的预期大小为 121 bp, 测定 HS2 整合的整合子拷贝数的 PCR 产物的预期大小为 238 bp。扩增后, 通过测得的 C_t 值和标准曲线来确定总整合子和发生整合的整合子的拷贝数。整合的整合子的拷贝数与总整合子的拷贝数之比为整合频率。我们进行了 20 次独立试验。

1.5 表型筛选法测定整合频率

HS2 的整合子携带 *aadA2* 基因盒, 所以会对链霉素产生耐药性。将培养的菌液用 LB 液体培养基稀释 100 倍后, 涂布在含有链霉素的 LB 琼脂平板上; 同时, 将上述培养液稀释 125 000 倍后, 涂布在不含抗生素的 LB 琼脂平板上。培养过夜后, 统计两种平板上的菌落数^[12]。实验一式三份。整合频率=(含链霉素的 LB 平板上的菌落数 $\times 100$)/(不含抗生素的 LB 平板上的菌落数 $\times 125 000$)

1.6 测量细菌摄取的银离子和铜离子含量

收集在不同浓度的 AgNO_3 和 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 处理后的细菌, 用冷的磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗 3 次, 用 ICP-MS 进一步测定金属离子^[13]。菌液 10 000 $\times g$ 离心沉淀 3 min, 然后细菌沉淀放入 Teflon 管中, 与硝酸(5 mL)混合消化 27 min (100、140、160、180 $^\circ\text{C}$ 各 3 min, 190 $^\circ\text{C}$ 15 min)。消化后, 样品冷却至室温, 取出消化槽, 用超纯水润洗 (至少润洗 3 次), 转移到 50 mL 容量瓶中, 用超纯水稀释定容至刻度, 待测。银和铜的标准曲线是由 ICP-MS 的多元素标准溶液制备的。

表 2 PCR 引物和序列

Table 2 PCR primers and sequences

Primers	Sequences (5'→3')	Comment
DHFQ	TAGCACCCACTGAAACCCAG	For determining the copy number of total integrons
ORFQ	CTGCGCAGCCCATGCAGGCGA	For determining the copy number of total integrons
AAFQ	CATCCACTGCGGAGCCGTAC	For determining the copy number of integrated integrons
5CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC	For determining the copy number of integrated integrons

1.7 转录组测序

1.7.1 测序样品制备及转录组测序

搜集对照组和 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 银离子实验组适量细菌,用无菌磷酸盐缓冲溶液清洗 2 次。对照组和实验组都进行了 3 次生物重复。按照 RNA 提取试剂盒说明书分别提取和纯化原始菌和整合频率降低菌株的总 RNA,委托上海欧易生物科技有限公司构建 cDNA 文库,将测序文库用测序平台 Illumina HiSeq 进行转录组测序。

1.7.2 基因表达量及差异表达基因功能分析

使用 RPKM (reads per kilobase of transcript per million fragments mapped)法计算基因表达量。RPKM 法能消除转录本长度和测序量差异对计算转录本表达的影响,计算得到的转录本表达量可直接用于比较不同样品间的转录本表达差异。使用 DESeq (2012) R package 的 estimate Size Factors 函数对 counts 数进行标准化,并使用 nbinom Test 函数计算差异比较的 P value 和 fold change 值。将 P 值小于 0.05 且差异倍数大于 2 作为筛选差异表达基因的标准,并通过超几何分布检验进行差异基因的 GO 和 KEGG 富集分析,以判定差异基因主要影响的生物学功能或者通路。

1.7.3 网络学分析

String 数据库是一个搜索已知蛋白质之间和预测蛋白质之间相互作用的数据库。研究蛋白之间的相互作用网络,有助于挖掘核心的调控基因。通过 String 数据库 <https://string-db.org/> 在差异表达基因中寻找枢纽基因,构建蛋白交互网络^[14]。然后使用 Cytospace 软件鉴定关键枢纽基因,并美化图片。

1.8 统计分析

对于连续变量和正态分布的数据采用平均值和标准差表示,用配对 t 检验或独立 t 检验评估差异。对于非正态分布的数据,采用中位数

和四分位数范围,用 Wilcoxon 秩和试验来检验组间差异。 P 值 <0.05 被认为有统计学意义。数据分析使用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 qPCR 测定整合频率

总整合子的标准曲线的回归方程为 $Y=-4.027X+59.163$, $R^2=0.996$ 。整合的整合子的标准曲线的回归方程为 $Y=-4.193X+59.710$, $R^2=0.997$ 。对照组和金属离子组 qPCR 扩增曲线见图 2。图 2 显示,无论是否添加金属离子,HS2 总整合子扩增曲线的 C_t 值相似,总整合子得到有效扩增(图 2A、2C)。同时,加入 0.9 和 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ag^+ 会使发生整合的整合子的 C_t 值变大(图 2B)。然而,铜离子组 HS2 发生整合的整合子的 C_t 值并没有明显的变化(图 2D)。熔解曲线为单峰,表明 PCR 扩增的特异性很好。对照组和金属离子组计算得到的整合频率见表 3,直方图见图 3。直方图中 0.9 和 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ag^+ 组明显低于对照组。经验证数据不符合正态分布,采用 Kruskal-Wallis 检验。对照组与不同浓度铜离子组的整合频率均没有统计学差异 ($P>0.05$),不同浓度铜离子组之间也没有统计学差异 ($P>0.05$)。但对照组与 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 银离子组均有明显的统计学差异 ($P<0.001$),0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 银离子组之间没有统计学差异 ($P>0.05$)。

2.2 表型筛选法的结果

不同浓度的银离子和铜离子实验组在 2 个平板上的生长情况见图 4。在普通 LB 平板上,对照组和金属离子组都长出了较多菌落(图 4A、C、E、G、I、K、M、O 和 Q)。在含有链霉素的 LB 平板上,0.9 和 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ag^+ 组观察到极少的菌落(图 4F 和 H),说明一定浓度的 Ag^+ 会抑制整合子捕获 *aadA2* 基因盒,使细菌对链霉素

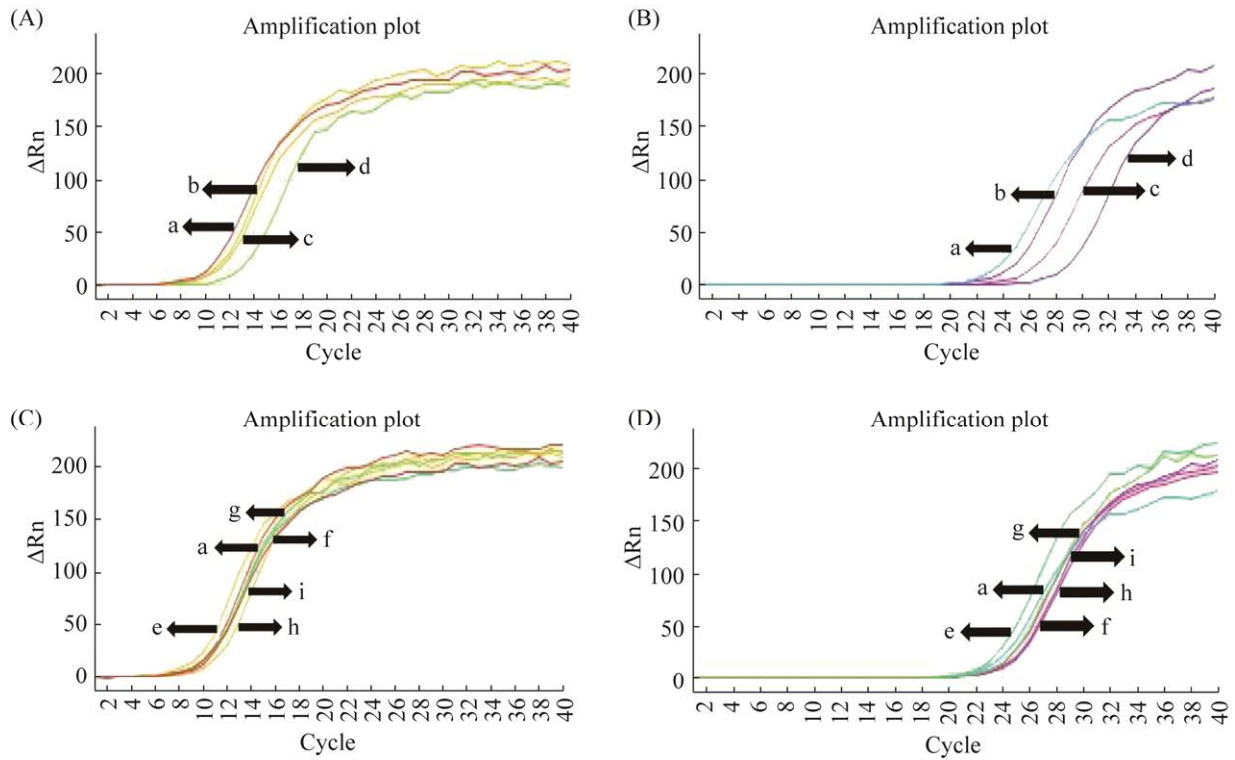


图 2 对照组与金属离子组 HS2 的扩增曲线

Figure 2 Amplification curves of HS2 in control group and metal ion group. A: amplification curves of total integrons in different concentrations of Ag^+ ; B: amplification curves of integrons integrated in different concentrations of Ag^+ . a: control (without metal ions); b: $0.3 \mu g/mL Ag^+$; c: $0.9 \mu g/mL Ag^+$; d: $1.5 \mu g/mL Ag^+$. C: amplification curves of total integrons in different concentrations of Cu^{2+} ; D: amplification curves of integrons integrated in different concentrations of Cu^{2+} . e: $5 \mu g/mL Cu^{2+}$; f: $50 \mu g/mL Cu^{2+}$; g: $100 \mu g/mL Cu^{2+}$; h: $150 \mu g/mL Cu^{2+}$; i: $210 \mu g/mL Cu^{2+}$.

表 3 qPCR 测得的整合频率

Table 3 Integration frequency measured using qPCR

Group	Control group	Silver ion group/($\mu g/mL$)			Copper ion group/($\mu g/mL$)				
		0.3	0.9	1.5	5	50	100	150	210
Integration frequency	2.59×10^{-4}	2.26×10^{-4}	9.42×10^{-5}	7.29×10^{-5}	2.60×10^{-4}	2.38×10^{-4}	2.25×10^{-4}	1.77×10^{-4}	2.62×10^{-4}
	(2.24×10^{-4} , 3.33×10^{-4})	(1.32×10^{-4} , 3.58×10^{-4})	(6.49×10^{-5} , 1.44×10^{-4})	(4.45×10^{-5} , 9.03×10^{-5})	(1.95×10^{-4} , 3.18×10^{-4})	(1.60×10^{-4} , 3.48×10^{-4})	(1.55×10^{-4} , 4.02×10^{-4})	(1.28×10^{-4} , 2.95×10^{-4})	(1.96×10^{-4} , 3.17×10^{-4})

的敏感性增强, 细菌生长受到抑制。而其他组在含有链霉素的 LB 平板上有较多的菌落(图 4B、J、L、N、P 和 R), 没有观察到 Cu^{2+} 对整合子捕获 *aadA2* 基因盒的抑制作用。整合频率以 3 次重复实验的平均值计算(表 4)。以上结果与 qPCR 实验结果一致。

2.3 细菌摄取的银和铜离子含量的测定

使用磷酸盐缓冲剂清洗细菌对细菌造成的损害最小^[15]。大肠杆菌 HS2 摄取的银和铜离子含量见表 5。从表中可以看出大肠杆菌 HS2 只能吸收很少的银和铜离子, 随着培养基中金属离子浓度增加, 细菌摄取金属的浓度也增加。有

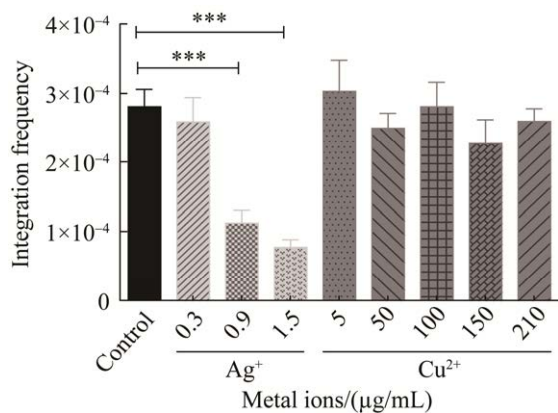


图3 qPCR 测定对照组与金属离子组 HS2 的整合频率

Figure 3 qPCR measurement of integration frequency of HS2 in control and metal ion groups. ***: $P < 0.001$.

研究表明,金属离子的毒性与其生物利用度有直接关联,而不是其暴露在体系外的浓度^[16-17]。因此,细菌摄取的金离子浓度才是影响细菌整合子整合反应的关键。

2.4 转录组测序结果分析

2.4.1 测序数据质量评估及差异表达基因分析

对原始数据进行过滤,主要包括去除接头(adapter)的 reads、去除含 N (N 表示无法确定碱基信息)的 reads、去除低质量 reads (Qphred ≤ 20 的碱基数占整个 read 长度的 50% 以上的 reads)。同时对 clean data 进行 Q20、Q30 和 GC 含量计算。后续所有分析均是基于 clean data 进行的高质量分析。通过 DESeq 分析后(图 5),对照组与

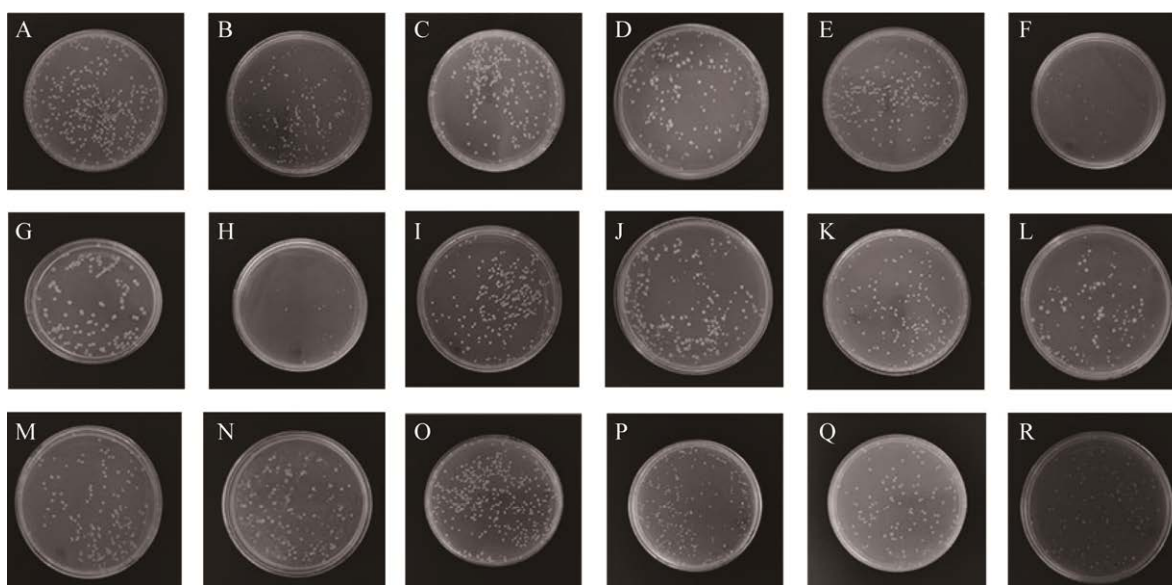


图4 对照组与金属离子组的 HS2 在 LB 平板和含链霉素 LB 平板上的生长情况

Figure 4 Growth of HS2 on LB plates and LB plates containing streptomycin in the control and metal ion groups. A: LB medium for control group (without addition of metal); B: LB medium containing streptomycin for control group; C: LB medium for 0.3 $\mu\text{g/mL}$ Ag⁺ group; D: LB medium containing streptomycin for 0.3 $\mu\text{g/mL}$ Ag⁺ group; E: LB medium for 0.9 $\mu\text{g/mL}$ Ag⁺ group; F: LB medium containing streptomycin for 0.9 $\mu\text{g/mL}$ Ag⁺ group; G: LB medium for 1.5 $\mu\text{g/mL}$ Ag⁺ group; H: LB medium containing streptomycin for 1.5 $\mu\text{g/mL}$ Ag⁺ group; I: LB medium for 5 $\mu\text{g/mL}$ Cu²⁺ group; J: LB medium containing streptomycin for 5 $\mu\text{g/mL}$ Cu²⁺ group; K: LB medium for 50 $\mu\text{g/mL}$ Cu²⁺ group; L: LB medium containing streptomycin for 50 $\mu\text{g/mL}$ Cu²⁺ group; M: LB medium for 100 $\mu\text{g/mL}$ Cu²⁺ group; N: LB medium containing streptomycin for 100 $\mu\text{g/mL}$ Cu²⁺ group; O: LB medium for 150 $\mu\text{g/mL}$ Cu²⁺ group; P: LB medium containing streptomycin for 150 $\mu\text{g/mL}$ Cu²⁺ group; Q: LB medium for 210 $\mu\text{g/mL}$ Cu²⁺ group; R: LB medium containing streptomycin for 210 $\mu\text{g/mL}$ Cu²⁺ group.

表 4 不同浓度的 Ag^+ 和 Cu^{2+} 影响下的 HS2 整合频率比较Table 4 Comparison of HS2 integration frequencies under the influence of different concentrations of Ag^+ and Cu^{2+}

Group	Control group	Silver ion group/($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Copper ion group/($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
		0.3	0.9	1.5	5	50	100	150	210
Number of colonies on LB plate (dilution multiple 1:125 000)	476	357	316	208	348	227	238	378	205
Number of colonies on LB plate containing streptomycin (dilution multiple 1:100)	242	175	36	23	218	122	115	265	143
Integration frequency	4.07×10^{-4}	3.92×10^{-4}	9.11×10^{-5}	8.85×10^{-5}	5.01×10^{-4}	4.30×10^{-4}	3.87×10^{-4}	5.61×10^{-4}	5.58×10^{-4}

表 5 ICP-mass 检测 HS2 中 Ag^+ 和 Cu^{2+} 含量Table 5 ICP-mass detection of Ag^+ and Cu^{2+} in HS2

Concentration of metal ions added to the culture medium/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Ag^+			Cu^{2+}	
	0.3	0.9	1.5	150	210
Concentration of metal uptake by bacteria/(mg/kg)	7.62 ± 0.87	9.67 ± 0.57	16.35 ± 6.62	27.16 ± 4.31	37.18 ± 5.83

实验组相比显著差异基因有 241 个, 其中 139 个上调表达基因, 下调表达基因 102 个。其中 \log_2 FC 值上调表达倍数为 5 以上有 17 个基因, 下调表达倍数绝对值为 5 以上的基因有 7 个。结果表明, 银离子抑制细菌整合子捕获耐药基因盒引起许多基因发生差异表达。

2.4.2 差异表达基因的功能富集分析和代谢通路富集分析

差异表达基因对 GO 功能的显著富集分析可以更好地探索差异表达基因所涉及的生理、代谢功能和生物学过程。实验组与对照组相比 GO 富集的前 30 个条目(图 6), 在生物过程方面发生富集的亚类主要有甲基半乳糖苷转运(methylgalactoside transport)、麦芽糖转运(maltose transport)、麦芽糊精转运(maltodextrin transport)、甘油分解过程(glycerol catabolic process)等; 在细胞组分主要发生富集的 GO 条目是细菌型鞭毛基体, 杆状物(bacterial-type flagellum basal body, rod)、细菌型鞭毛钩(bacterial-type flagellum hook)、麦芽糖转运复合体(maltose transport

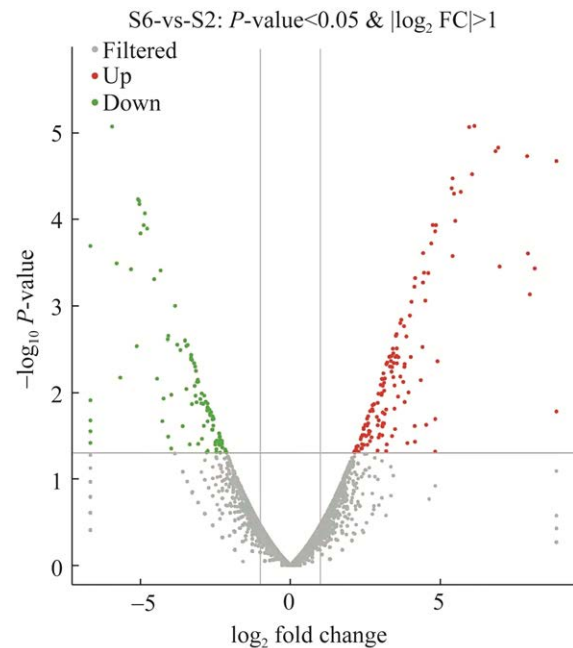


图 5 差异基因火山图(红色点表示上调基因, 绿色点表示下调基因, 灰色点表示无差异基因)

Figure 5 Volcano plot of differentially expressed genes (DEGs). Red dots indicate the up-regulated DEGs, green dots indicate the down-regulated DEGs, and gray dots represent genes with no significant difference.

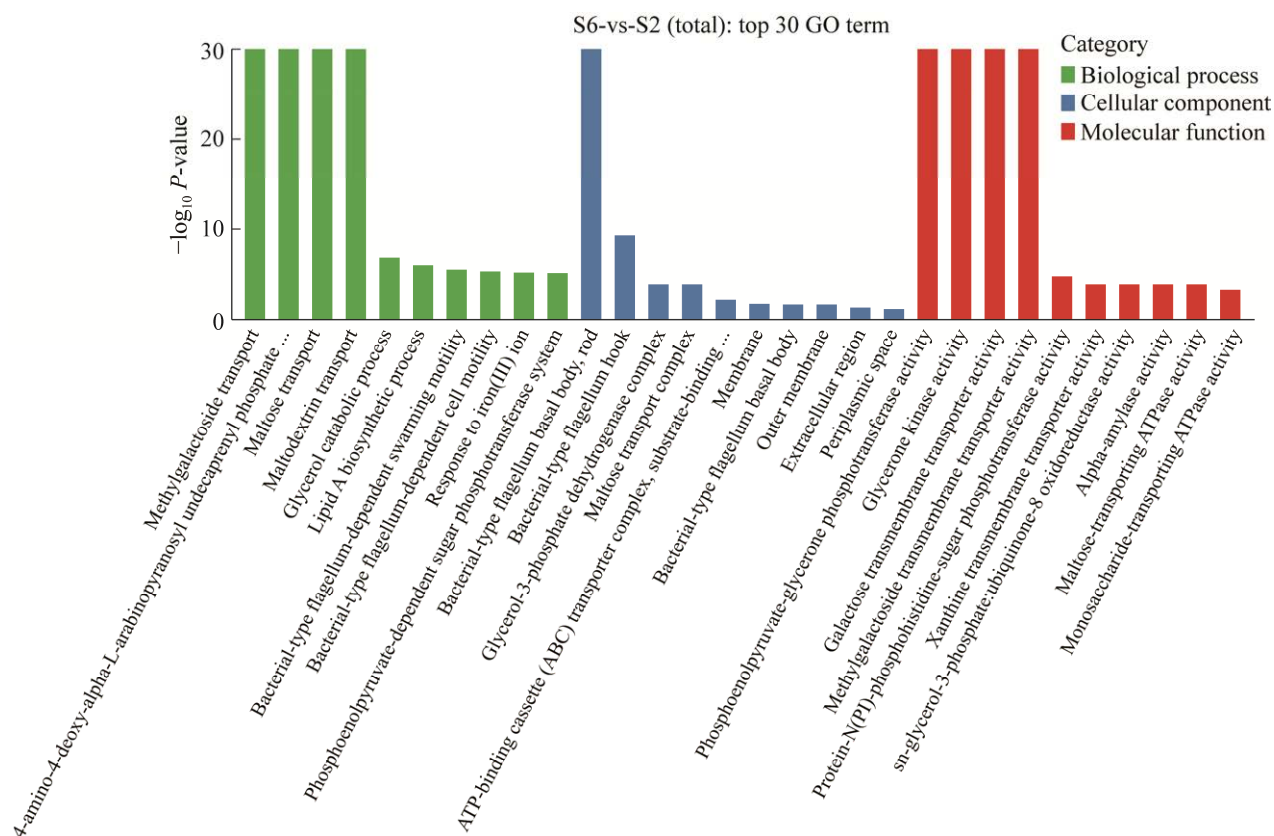


图 6 实验组与对照组差异基因的 GO 富集图

Figure 6 GO enrichment map of differential genes between experimental group and control group. The vertical coordinate is $-\log_{10} P\text{-value}$, the larger the vertical coordinate the more reliable the enrichment of differentially expressed genes in the results of this functional annotation. The horizontal coordinate is the GO term. $P\text{-value} < 0.05$ is the significant level and $P\text{-value} < 0.01$ is the highly significant level.

complex)等; 在分子功能发生主要富集的 GO 条目有磷酸烯醇式丙酮酸-甘油磷酸转移酶活性(phosphoenolpyruvate-glycerone phosphotransferase activity)、甘油激酶活性(glycerone kinase activity)、半乳糖跨膜转运蛋白活性(galactose transmembrane transporter activity)、甲基半乳糖跨膜转运蛋白活性(methylgalactoside transmembrane transporter activity)等。

KEGG 通路富集分析可以更好地探索差异表达基因所涉及的生化代谢途径和信号转导途径。此次分析将 155 个差异基因注释到 KEGG 的 21 条通路上。选择富集最显著的 20 条途径进

行展示(图 7)。分别为氨基酸糖和核苷酸糖代谢(amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、鞭毛组装(flagellar assembly)、阳离子抗菌肽(CAMP)耐药性[cationic antimicrobial peptide (CAMP) resistance]、果糖和甘露糖代谢、磷酸糖转移酶系统[phosphotransferase system (PTS)]、甘油脂代谢(glycerolipid metabolism)、药物代谢(drug metabolism-other enzymes)、硒化合物代谢(selenocompound metabolism)、精氨酸生物合成(arginine biosynthesis)、淀粉和蔗糖代谢(starch and sucrose metabolism)、ABC 转运(ABC transporters)、嘧啶代谢(pyrimidine metabolism)、

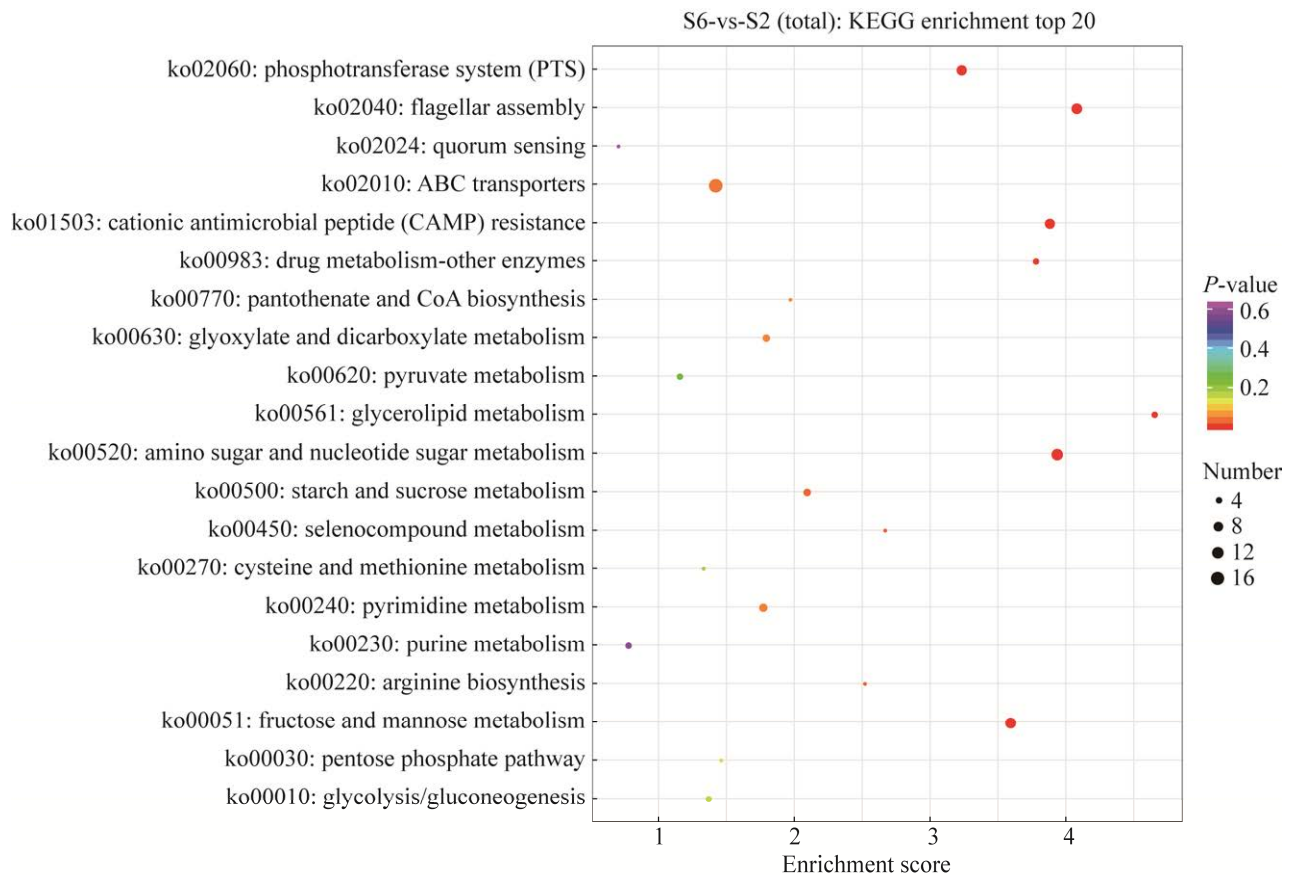


图 7 差异表达基因的 KEGG 通路富集分析结果

Figure 7 Enrichment analysis result for KEGG pathway of differentially expressed genes. Each circle in the graph represents a KEGG pathway, and the horizontal coordinate is the enrichment factor, which represents the ratio of the proportion of all genes annotated to a pathway to the proportion of differentially expressed genes annotated to that pathway. The smaller the enrichment factor, the more significantly the differentially expressed genes are enriched in that pathway. The vertical coordinate is the KEGG pathway. *P*-value relative to the applied colour indicates that a smaller *P*-value and a redder colour indicates a more reliable enrichment significance of differentially expressed genes in that pathway.

乙醛酸和二羧酸代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism)、泛酸盐和辅酶 A 的生物合成(pantothenate and CoA biosynthesis)、磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway)、糖酵解和糖异生(glycolysis/gluconeogenesis)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢(cysteine and methionine metabolism)、丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)、嘌呤代谢(purine metabolism)、群体感应(quorum sensing)。富集最多基因的 KEGG 通路为碳水化合物代

谢, 有 38 个基因。

2.4.3 网络学分析

转录组分析后, 得到大量差异表达基因, 把差异表达基因进行网络分析, 寻找枢纽基因。枢纽基因就是在网络图中与其他基因高度连接的基因^[18]。本研究差异表达基因构建的蛋白互作网络图见图 8。图中红色表示上调基因, 蓝色表示下调基因, 图形越大说明连接节点数越多。结果表明, 具有最高节点的前 12 个基

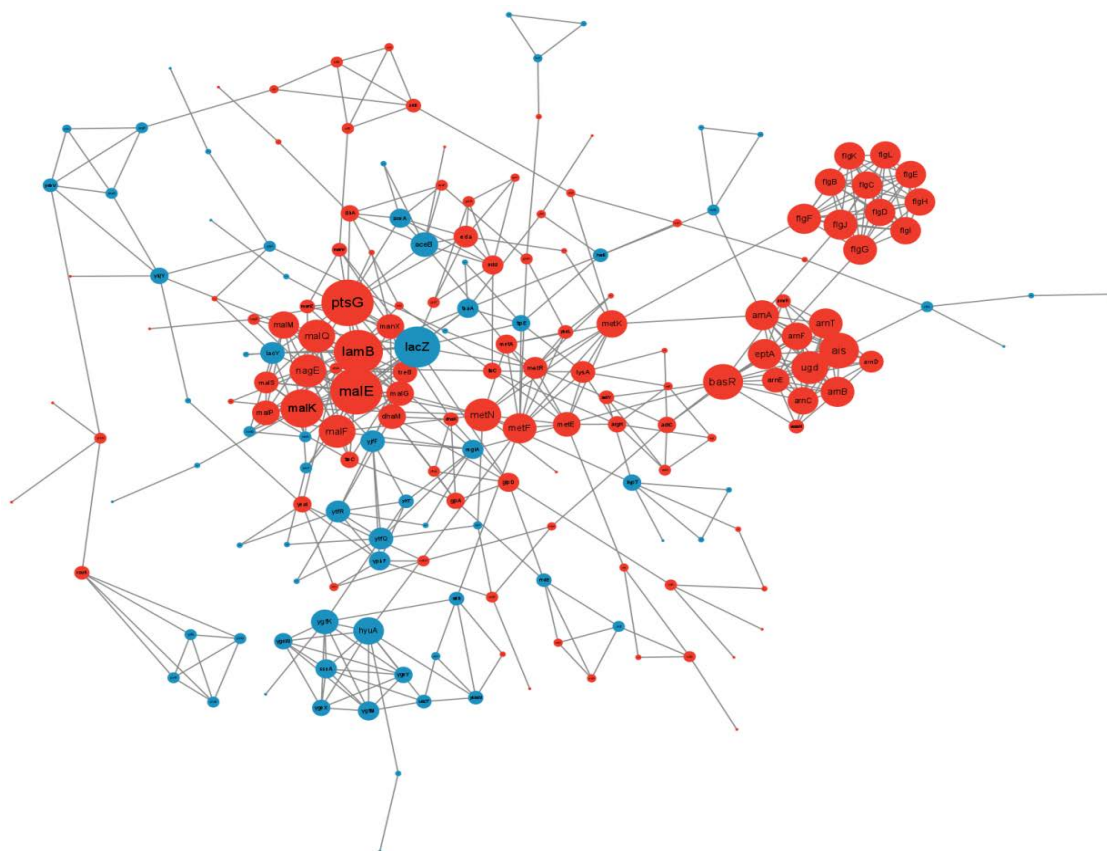


图 8 差异表达基因的蛋白互作网络图

Figure 8 Protein interaction network diagram of differentially expressed genes.

因分别为 *ptsG*、*malE*、*lamB*、*lacZ*、*malK*、*basR*、*ais*、*ugd*、*nagE*、*metN*、*malQ* 和 *malF*。基因 *malE*、*lamB*、*malK*、*malQ* 和 *malF* 主要负责麦芽糖的转运；基因 *ptsG* 和 *nagE* 主要参与 PTS 转移酶系统；基因 *basR*、*ais*、*ugd* 与多粘菌素抗性有关。在最高节点的前 12 个基因，只有 *lacZ* (编码 β -半乳糖苷酶) 基因表达下调。

3 讨论与结论

细菌整合子功能强大，可以捕捉和表达各种基因盒，赋予细菌新的性状。新的性状不仅使细菌获得耐药性，还使细菌获得适应环境

的能力^[19]。要有效抑制细菌耐药性的产生，需要了解影响整合子捕获基因盒的因素和相关机制。我们研究了 Ag^+ 和 Cu^{2+} 对整合子整合频率的影响。研究表明，一定浓度的银离子可以抑制细菌整合子的整合作用，而铜离子对整合子的整合作用没有明显的影响，因此并非所有具有抗菌性的金属离子都对整合反应有影响。为了进一步探讨银离子抑制整合子捕获耐药基因盒的机制，对在 $1.5 \mu\text{g/mL}$ Ag^+ 作用下整合频率降低的大肠杆菌进行了转录组测序分析。通过对整合频率降低菌株差异表达基因的分析，为后续筛选出整合子捕获基因盒涉及的枢纽基因及可能参与的代谢途径提供实验依据。

本研究通过对差异表达基因富集分析发现, 差异基因大多数与碳水化合物代谢、氨基酸代谢、膜运输、细胞移动等通路有关, 以及涉及细胞过程、代谢过程、细胞组分、催化活性等功能。大肠杆菌利用环境中的碳水化合物作为生长代谢的碳源和能源。葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、木糖等在自然界中含量丰富, 是微生物常用的重要碳源。利用不同的碳源需要一套不同的基因来编码特定的转运体、调节因子和代谢功能酶^[20]。如果生长介质中有足够的葡萄糖(优先利用), 那么对其他碳源的运输和代谢所必需的酶的合成就会受到抑制。这种现象被称为碳分解代谢抑制(carbon catabolite repression, CCR)。在大肠杆菌中, CCR 参与细胞内 cAMP (cyclic AMP)、腺苷酸环酶(adenylate cyclase, AC)的调控。CRP 是 cAMP 受体蛋白可以被 cAMP 激活与之形成复合体, 是碳阻遏调控的蛋白复合体。已有研究表明, 通过 cAMP-CRP 途径可以对耐药基因盒的表达进行调控^[21]。本研究发现, 差异基因 KEGG 通路富集最多的是碳水化合物代谢, 有 38 个差异基因。而且, 在大肠杆菌中银离子作用的蛋白质大多与大肠杆菌的中心碳代谢有关^[22]。所以, 银离子抑制细菌整合子捕获耐药基因盒的机制可能涉及细菌的碳分解代谢过程。

在银离子抑制整合子整合频率的细菌转录组学差异表达基因的分析中发现, 麦芽糖转运和代谢相关基因 *malG*、*malF*、*malK*、*malE*、*malM* 和 *lamB* 基因表达都显著上调($\log_2 FC > 6$)。而且在蛋白互作网络图中, 枢纽基因参与麦芽糖转运。已有学者对细菌整合子整合频率明显增高的细菌进行基因芯片分析, 发现与麦芽糖相关的基因 *malG*、*malF*、*malK*、*malM*、*malQ*、*malP*、*malS* 表达显著下调^[23], 与本研究结果相验证。此外, 麦芽糖代谢与大肠杆菌噬菌体感

染易感性有关^[24]。推测麦芽糖转运可能参与细菌避免外界伤害, 保护自身稳定的过程。细菌整合子整合基因盒就是细菌抵抗外界环境变化的一种表现, 所以需要进一步研究麦芽糖转运与整合子整合基因盒的关系。整合子捕获基因盒机制的研究尚未和麦芽糖转运和代谢产生关联, 这为整合子捕获基因盒机制的研究提供新的方向。

使用新的金属材料来对抗细菌感染是一个热门趋势^[25-26]。因为金属在细菌和哺乳动物中金属运输系统和金属蛋白的不同, 所以金属作用于细菌和哺乳动物的靶标是可以区分的^[27], 从而避免金属对哺乳动物的毒害作用。因此, 将抗生素和适量的 Ag^+ 结合使用, 在杀灭细菌的同时还可以延缓耐药性的产生。整合子调控耐药基因盒可能与大肠杆菌中麦芽糖转运和碳分解代谢过程有一定联系。然而, 整合子捕获基因盒具体机制报道相对很少, 需要进一步研究和验证。本研究给整合子的研究提供了一个新方向。

参考文献

- [1] Tyrrell C, Burgess CM, Brennan FP, Walsh F. Antibiotic resistance in grass and soil. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(1): 477-486.
- [2] Choi S, Sim W, Jang D, Yoon Y, Ryu J, Oh J, Woo JS, Kim YM, Lee Y. Antibiotics in coastal aquaculture waters: occurrence and elimination efficiency in oxidative water treatment processes. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 396: 122585.
- [3] Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(2): 10.1128.
- [4] Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology*, 1989, 3(12): 1669-1683.
- [5] Mutua F, Sharma G, Grace D, Bandyopadhyay S, Shome B, Lindahl J. A review of animal health and drug use practices in India, and their possible link to antimicrobial resistance. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2020, 9(1): 103.

- [6] Jové T, Da RS, Denis F, Mazel D, Ploy MC. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genetics*, 2010, 6(1): e1000793.
- [7] Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S, Gonzalez-Zorn B, Barbé J, Ploy MC, Mazel D. The SOS response controls integron recombination. *Science*, 2009, 324(5930): 1034.
- [8] Mehta AC, Muscarella LF. Bronchoscope-related “superbug” infections. *Chest*, 2020, 157(2): 454–469.
- [9] Raza A, Ngieng SC, Sime FB, Cabot PJ, Roberts JA, Popat A, Kumeria T, Falconer JR. Oral meropenem for superbugs: challenges and opportunities. *Drug Discovery Today*, 2021, 26(2): 551–560.
- [10] 王楚彪, 卢万鸿, 林彦, 罗建中. 转接组测序的发展和应. *梭树科技*, 2018, 35(4): 20–26.
Wang CB, Lu WH, Lin Y, Luo JZ. Development and application of transcriptome sequencing. *Eucalypt Science & Technology*, 2018, 35(4): 20–26. (in Chinese)
- [11] Yang ZH, Jiang XF, Wei QH, Chen N, Lu Y. A novel and rapid method for determining integration frequency catalyzed by integron integrase intI1. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 76(1): 97–100.
- [12] 杨泽华, 蒋晓飞, 魏取好, 陈楠, 吕元. 利用表型筛选法测定整合子对耐药性基因盒的整合频率. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2008, 28(8): 729–732.
Yang ZH, Jiang XF, Wei QH, Chen N, Lü Y. Detection of integration frequency catalyzed by integrase using phenotypic screening method. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2008, 28(8): 729–732. (in Chinese)
- [13] Wang H, Yan A, Liu Z, Yang X, Xu Z, Wang Y, Wang R, Koochi-Moghadam M, Hu L, Xia W, Tang H, Wang Y, Li H, Sun H. Deciphering molecular mechanism of silver by integrated omic approaches enables enhancing its antimicrobial efficacy in *E. coli*. *PLoS Biology*, 2019, 17(6): e3000292.
- [14] Li Y, Wang JS, Zhang T, Wang HC, Li LP. Identification of new therapeutic targets for gastric cancer with bioinformatics. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 865.
- [15] Zhang Y, Zhang Z, Suzuki K, Maekawa T. Uptake and mass balance of trace metals for methane producing bacteria. *Biomass and Bioenergy*, 2003, 25(4): 427–433.
- [16] Low CX, Tan LT, Ab MN, Pusparajah P, Goh BH, Chan KG, Letchumanan V, Lee LH. Unveiling the impact of antibiotics and alternative methods for animal husbandry: a review. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10(5): 578.
- [17] Yan K, Naidu R, Liu Y, Wijayawardena A, Duan L, Dong Z. A pooled data analysis to determine the relationship between selected metals and arsenic bioavailability in soil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15(5): 888.
- [18] Mahapatra S, Bhuyan R, Das J, Swarnkar T. Integrated multiplex network based approach for *hub* gene identification in oral cancer. *Heliyon*, 2021, 7(7): e07418.
- [19] Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D. The integron: adaptation on demand. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(2): A3–A19.
- [20] Luo Y, Zhang T, Wu H. The transport and mediation mechanisms of the common sugars in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(5): 905–919.
- [21] 王娟. 大肠杆菌 cAMP-CRP 途径调控I型整合子中耐药基因盒表达的机制研究. 山东大学硕士学位论文, 2018.
- [22] Wang H, Wang M, Yang X, Xu X, Hao Q, Yan A, Hu M, Lobinski R, Li H, Sun H. Antimicrobial silver targets glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in glycolysis of *E. coli*. *Chemical Science*, 2019, 10(30): 7193–7199.
- [23] 杨泽华. 整合子捕获基因盒效率调控机制研究. 复旦大学博士学位论文, 2008.
- [24] Boos W, Shuman H. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(1): 204–229.
- [25] Lado-Touriño I, Páez-Pavón A. Interaction between graphene-based materials and small Ag, Cu, and CuO clusters: a molecular dynamics study. *Nanomaterials (Basel)*, 2021, 11(6): 1378.
- [26] Fan X, Yahia L, Sacher E. Antimicrobial Properties of the Ag, Cu nanoparticle system. *Biology (Basel)*, 2021, 10(2): 137.
- [27] Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(6): 371–384.