



转录组分析揭示盐酸克林霉素胁迫下嗜根考克氏菌 DC2201 的响应机制

张小梅, 彭萱, 龙雨欣, 倪海燕, 邹龙, 龙中儿*

江西师范大学生命科学学院 南昌市鄱阳湖湿地微生物资源开发与利用重点实验室, 江西 南昌 330022

张小梅, 彭萱, 龙雨欣, 倪海燕, 邹龙, 龙中儿. 转录组分析揭示盐酸克林霉素胁迫下嗜根考克氏菌 DC2201 的响应机制[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2731-2751.

ZHANG Xiaomei, PENG Xuan, LONG Yuxin, NI Haiyan, ZOU Long, LONG Zhong'er. Transcriptome analysis reveals the response mechanism of *Kocuria rhizophila* DC2201 to clindamycin hydrochloride[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2731-2751.

摘要: 【目的】研究 0.5 倍最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的盐酸克林霉素胁迫下, 嗜根考克氏菌 DC2201 的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 揭示盐酸克林霉素胁迫下嗜根考克氏菌(*Kocuria rhizophila*) DC2201 的响应机制。【方法】以 LB 液体培养基培养的嗜根考克氏菌 DC2201 细胞为对照, 采用 Illumina HiSeq 测序平台进行 RNA-seq 双端测序, 分析 0.5 MIC 的盐酸克林霉素胁迫下嗜根考克氏菌的基因表达情况, 并采用实时荧光定量 PCR 方法验证。【结果】从盐酸克林霉素胁迫下的嗜根考克氏菌中共筛选到 1 202 个显著 DEGs, 其中显著上调表达基因 604 个, 显著下调表达基因 598 个。经基因本体论(gene ontology, GO)注释, 筛选到分子功能(molecular function, MF)、细胞组分(cellular component, CC)和生物学过程(biological process, BP) 3 个一级分类指标, 35 个二级分类指标共 1 041 个显著 DEGs。经京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)注释, 筛选到与 DNA 修复途径相关的显著 DEGs 16 个, 与核糖体合成途径相关的显著 DEGs 43 个, 与 ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白相关的显著 DEGs 28 个, 与戊糖磷酸途径、糖酵解、三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环、淀粉与蔗糖、丙酮酸、丁酸等碳水化合物代谢相关的显著 DEGs 77 个, 与肽聚糖合成相关的显著 DEGs 5 个。【结论】盐酸克林霉素胁迫下, 嗜根考克氏菌 DC2201 的响应机制是一个全局性反应机制, 细菌通过增强多重耐药性(multidrug resistance, MDR)家族的主要促进者超家族(major

资助项目: 国家自然科学基金(31960015); 江西省自然科学基金(20192BAB204001)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31960015) and the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20192BAB204001).

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

Received: 2024-01-08; Accepted: 2024-03-27; Published online: 2024-04-02

facilitator superfamily, MFS)转运体的表达来增加对盐酸克林霉素的外排, 通过增强 DNA 修复和 RNA 代谢途径, 以保证基因组的稳定性和 RNA 的正常功能, 通过增强核糖体合成途径来弥补盐酸克林霉素与自身 50S 核糖体结合后导致的蛋白质合成障碍, 以提高蛋白质合成效率。与此同时, 减少碳水化合物的吸收和转运, 抑制自身的能量代谢途径, 以减缓自身的生长速率而降低对能量的需求, 相应地, 细胞壁的稳定性和也受到影

关键词: 嗜根考克氏菌 DC2201; 盐酸克林霉素; 转录组; 响应机制

Transcriptome analysis reveals the response mechanism of *Kocuria rhizophila* DC2201 to clindamycin hydrochloride

ZHANG Xiaomei, PENG Xuan, LONG Yuxin, NI Haiyan, ZOU Long, LONG Zhong'er*

Nanchang Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation & Utilization from Poyang Lake Wetland, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

Abstract: [Objective] To mine the differentially expressed genes (DEGs) of *Kocuria rhizophila* DC2201 exposed to clindamycin hydrochloride at 0.5 minimum inhibitory concentration (MIC) and reveal the response mechanism of *Kocuria rhizophila* DC2201 to clindamycin hydrochloride. [Methods] With the *Kocuria rhizophila* DC2201 cells cultured in LB liquid medium as the control, Illumina HiSeq platform was used for paired-end sequencing to determine the gene expression of *Kocuria rhizophila* DC2201 cells exposed to clindamycin hydrochloride at 0.5 MIC. Real-time fluorescence quantitative PCR was then conducted for validation. [Results] A total of 1 202 significantly DEGs were screened out from *Kocuria rhizophila* DC2201 under the stress of clindamycin hydrochloride, including 604 significantly up-regulated genes and 598 significantly down-regulated genes. After gene ontology (GO) annotation, 1 041 significantly DEGs were annotated into 35 GO terms of molecular function (MF), cell composition (CC), and biological process (BP). The Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis predicted 16 significantly DEGs related to DNA repair, 43 significantly DEGs related to ribosomal synthesis, 28 DEGs associated with ATP-binding cassette (ABC) transporters, 77 significantly DEGs associated with the pentose phosphate pathway, glycolysis, tricarboxylic acid (TCA) cycle, starch and sucrose, pyruvate, butyrate and other carbohydrate metabolisms, and 5 significantly DEGs related to peptidoglycan synthesis. [Conclusion] *Kocuria rhizophila* DC2201 exposed to clindamycin hydrochloride adopts a global response mechanism. It increases the efflux of clindamycin hydrochloride by up-regulating the gene expression of major facilitator superfamily (MFS) transporters in the multidrug resistance (MDR) family. By enhancing DNA repair and RNA metabolism pathways, the strain ensures the genomic stability and normal RNA function. In

addition, it enhances the ribosome synthesis pathway to compensate for the protein synthesis barrier caused by the binding of clindamycin hydrochloride with the 50S ribosome. Furthermore, the strain reduces the absorption and transportation of carbohydrates to restrain the energy metabolisms pathways, thus slowing down the growth and reducing the energy demand. Correspondingly, the cell wall stability of *Kocuria rhizophila* DC2201 is also affected.

Keywords: *Kocuria rhizophila* DC2201; clindamycin hydrochloride; transcriptome; response mechanism

质控菌株常用于评价商业培养基和生化试剂盒的质量、检测抗菌剂的抗菌强度^[1-2]。由于抗生素等抗菌药物的不当使用或过度使用,质控菌株有时也会对抗生素等抗菌药物产生耐药性,进而影响抗菌药物的抗菌强度测试结果,从而对抗生素的质量控制和效果评估带来挑战。研究质控菌株对抗生素的响应机制,有助于揭示细菌对抗菌药物的适应和抵抗机制。

考克氏菌属是一类革兰氏阳性细菌,属于放线菌目,微球菌科,广泛分布于自然界中^[3-6],具有耐盐性、耐有机溶剂和降解酚类化合物的能力^[7-9]。嗜根考克氏菌(*Kocuria rhizophila*) DC2201,原名为藤黄微球菌 ATCC 9341,最早从根际样品中分离得到,常作为质控菌株,用于抗生素等抗菌药物抗菌性能的检测^[10]。虽然嗜根考克氏菌 DC2201 是一株常用于抗生素敏感性试验的质控菌株,但有关嗜根考克氏菌 DC2201 对抗生素的敏感性和响应机制却知之甚少。

克林霉素是一种林可酰胺类抗生素,对大多数革兰氏阳性菌具有抑菌作用,通过与 50S 核糖体亚基结合抑制细菌蛋白质的合成,从而抑制细菌的生长^[11]。本研究通过对盐酸克林霉素胁迫下的嗜根考克氏菌 DC2201 进行转录组测序分析,目的在于揭示嗜根考克氏菌 DC2201 在抗生素作用下的响应机制,有助于理解嗜根考克氏菌 DC2201 对抗菌药物的适应性和拮抗机制,对开发更有效的质量控制策略和提高质控菌株的应用价值具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 菌株及试剂

嗜根考克氏菌 DC2201,由江西师范大学生命科学学院提供,储存于 50%甘油中,−80 °C 冷冻保存。

LB 培养基的配制参考李舜岩等^[12]的方法, MH 培养基的配制参考杨秋玲等^[13]的方法。

盐酸克林霉素(以下简称“克林霉素”),北京索莱宝科技有限公司;细菌总 RNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;cDNA 反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;其他化学试剂,上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 主要仪器

测序平台 Illumina HiSeq, Illumina 公司; NanoDrop 2000、高速离心机、实时荧光定量 PCR 仪, ThermoFisher Scientific 公司;全自动微生物生长曲线测定仪,广州昇锐生物科技有限公司;扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM),日立公司。

1.3 菌株的活化培养

将−80 °C 冷冻甘油管中保藏的嗜根考克氏菌 DC2201 菌种划线至 LB 固体培养基上,37 °C 培养 24 h。

1.4 克林霉素对嗜根考克氏菌 DC2201 的 MIC

采用试管二倍稀释法^[14]测定克林霉素的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

1.5 克林霉素胁迫处理

从活化平板上挑取单克隆接种至装有 100 mL LB 液体培养基的三角摇瓶中, 37 °C、200 r/min 培养 18 h。按 3%比例将培养物分别转接至两组装有 100 mL LB 液体培养基的三角摇瓶中, 其中一组三角摇瓶中的 LB 液体培养基中添加终浓度为 0.5 MIC 的克林霉素(处理组), 另一组三角摇瓶中的 LB 液体培养基未加克林霉素(对照组)。每组设 3 个生物学重复, 其中处理组的 3 个生物学重复分别记为 K1、K2、K3, 对照组的 3 个生物学重复分别记为 M1、M2、M3。所有摇瓶于 37 °C、200 r/min 培养 8 h 后, 4 °C、4 000×g 离心 10 min 收集菌体。

1.6 RNA 的提取

采用 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司], 按照说明书方法从收集的菌样中提取 RNA, 使用 cDNA 反转录试剂盒中的 gDNA Eraser 去除基因组 DNA, 对 RNA 进行质量检测, 确保其质量合格后, 再用于后续的建库流程。

1.7 转录组测序

将提取得到的合格 RNA 样品分别去除 rRNA, 加入 fragmentation buffer, 将 mRNA 随机断裂成 200 bp 左右的小片段, 之后以 mRNA 为模板, 利用随机引物反转录合成双链 cDNA 并进行碱基修饰用于构建 cDNA 文库。经 PCR 扩增和微型荧光定量后, 利用 Illumina HiSeq 测序平台进行 RNA-seq 双端测序。RNA 提取、cDNA 文库构建及测序过程均由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.8 生物信息学分析

利用 Illumina 平台生成的数据进行生物信息学分析, 并对提供的参考基因进行基础的功能注释, 基于蛋白序列与非冗余蛋白数据库(non-redundant protein sequence database, NR)、Swiss-Prot 数据库(<https://web.expasy.org/docs/>

swiss-prot_guideline.html)、Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)、基因本体论数据库(gene ontology, GO)数据库(<http://www.geneontology.org/>)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)等五大数据库进行比对, 得到相应的功能注释信息。

1.9 基因差异表达分析

实验通过软件 RSEM 分别对基因的表达水平进行定量分析, 定量指标为每百万条 reads 的转录本(transcript per million, TPM), 利用差异分析软件 DESeq2、显著性水平 *P*-adjust 以及多重检验校正方法 Benjamini-Hochberg (BH)方法三方面对基因的表达量及差异倍数进行统计分析, 确定处理组中的显著差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 并对这些显著性 DEGs 进行 GO 分析和 KEGG 代谢途径分析, 以确定显著 DEGs 在功能上的分布与主要涉及的代谢通路。

1.10 实时荧光定量 PCR 验证差异表达基因

为验证转录组测序数据的准确性, 实验通过实时荧光定量 PCR 验证 DEGs 的表达水平。首先使用 cDNA 反转录试剂盒将 1.6 中获得的 RNA 反转录成 cDNA, 反应体系为(20 μL): gDNA Eraser 去除基因组 DNA 后获得的反应液 10 μL, RT Primer Mix 1 μL, PrimerScript RT Enzyme Mix I 1 μL, 5×Primer Script Buffer 2 (for real time) 4 μL, RNase Free ddH₂O 4 μL。反应参数设置: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 5 min。再根据转录组测序分析的结果, 以 16S rRNA 基因为内参基因, 随机挑选 5 个 DEGs 进行实时荧光定量 PCR 验证, 通过 Primer5.0 软件设计引物, 具体序列见表 1, 并交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。实时荧光定量 PCR 的反应体系(20.0 μL): cDNA 4.0 μL, 2×TB Green Premix

Ex Taq II (Tli RnaseH Plus) 10.0 μL , 50 \times ROX Reference Dye II 0.4 μL , 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)和反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL , 灭菌水 4.8 μL 。扩增(采用两步法扩增)反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 34 s, 循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算实时荧光定量 PCR 的数据, 得到基因的相对表达量。

1.11 菌体形态观察

按照 1.5 中方法分别收集克林霉素胁迫处理组和对照组细菌, 加入 2%戊二醛, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 3 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 $\times g$ 离心 5 min 去除戊二醛, 依序用 30%、50%、60%、70%、80%和 100%浓度的乙醇各脱水 10 min。最后, 将处理好的细菌样品滴在扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)支架上, 用 Au 溅射包覆, SEM 观察细菌形态。

1.12 菌体生长曲线测定

按照 1.5 中方法分别培养对照组和处理组嗜根考克氏菌 DC2201 细胞, 通过全自动微生物生长曲线测定仪分别测量嗜根考克氏菌 DC2201 的生长曲线。

2 结果与分析

2.1 克林霉素胁迫下的嗜根考克氏菌 DC2201 生长状况

首先测定了克林霉素对嗜根考克氏菌 DC2201 的 MIC 为 0.156 25 $\mu\text{g/mL}$, 低于《全国细菌耐药监测网技术方案(2020 年版)》的 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 克林霉素耐药标准^[15], 表明嗜根考克氏菌 DC2201 对克林霉素敏感, 符合质控菌种的质量要求; 然后分析了 0.5 MIC (0.078 $\mu\text{g/mL}$)克林霉素胁迫下的嗜根考克氏菌 DC2201 的生长情况, 结果表明克林霉素的胁迫处理会大大降低嗜根考克氏菌 DC2201 的生长速度(图 1A), 同时嗜根考克氏菌 DC2201 细胞表面出现明显的塌陷现象, 细胞形态发生明显的变形(图 1B、1C)。

2.2 转录组测序样品

实验分别提取了 0.5 MIC 的克林霉素处理组和对照组的嗜根考克氏菌 DC2201 总 RNA, 其 OD_{260}/OD_{280} 、 OD_{260}/OD_{230} 以及 RQN 值分析结果(表 2)表明, 所提取 RNA 质量较高, 满足建库需求。

表 1 实时荧光定量 PCR 的基因引物序列

Table 1 Primer sequences of the genes for qRT-PCR

Primer name	Primer sequence (5'→3')
<i>KRH_RS02815-F (secE)</i>	TTCGACGCATCTGGCTGTTT
<i>KRH_RS02815-R (secE)</i>	TGAATGCCACGAACACCAGCAC
<i>KRH_RS05185-F (lepB)</i>	ACGTCAAACGCGTGATGGC
<i>KRH_RS05185-R (lepB)</i>	CATCCCCAGGGTAGACGTAGTC
<i>KRH_RS00615-F</i>	AGCAGTGGCTCGAGCAGTTC
<i>KRH_RS00615-R</i>	GATGTTGTCCACGTAGCGCTC
<i>KRH_RS06330-F (recO)</i>	CGCATCGTGATCCTGCTCAG
<i>KRH_RS06330-R (recO)</i>	AGACGATGTCCAGCGACCGG
<i>KRH_RS06555-F (efp)</i>	CGCAGCGAGTACCAGTACCTGTAC
<i>KRH_RS06555-R (efp)</i>	CTGGTTCTCGAGCATGAAGTTGGC
16S-F	GGGTTTTACTGGTTTTGGATGGGC
16S-R	CGTGTCTCAGTCCCCAGTGTGGG

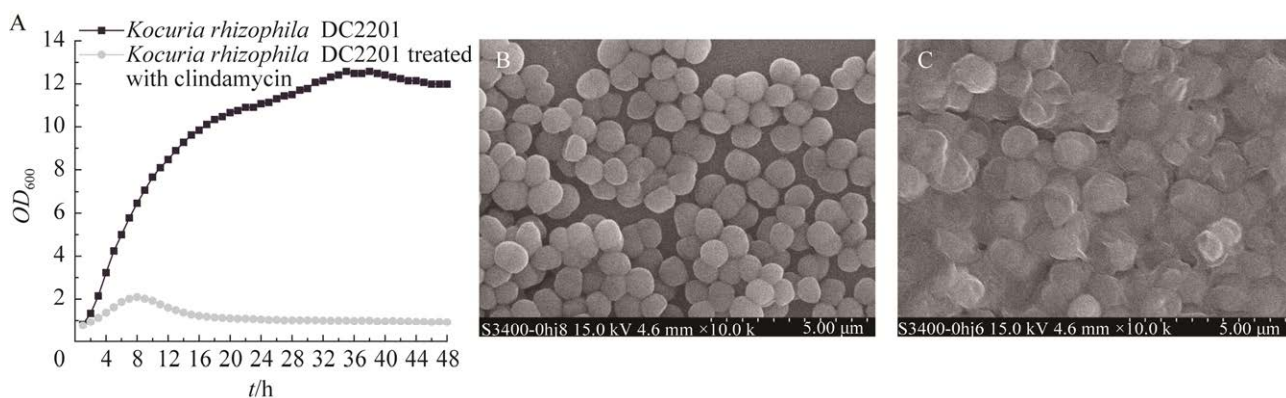


图 1 嗜根考克氏菌 DC2201 的生长曲线图和细胞 SEM 图

Figure 1 Growth curves and cellular SEM of *Kocuria rhizophila* DC2201. A: Growth curves of *Kocuria rhizophila* DC2201. B: SEM image of cells in the control group. C: SEM image of cells in the treatment group (grown in medium containing clindamycin at 0.5 MIC).

2.3 转录组测序数据质控

样品测序所得数据的质量评估情况如表 3 所示, 处理组和对照组分别获得 89 636 598 和 87 144 566 个原始序列数据双端 reads。测序数据已提交至国家微生物科学数据中心, 获登录号 NMDC10018677。数据质控后分别计算 Phred 数值大于 20 和 30 的碱基占总碱基的百分比, 结果发现数据经过滤后其碱基组成的结果均为 Q20 大于 98.00%, Q30 大于 95.00%, 错误率均小于 0.02%, 处理组和对照组分别获得 88 904 274 和 85 854 296 个质控后双端 reads, 测序质量合格。

与此同时, 实验分析了生物学重复样本之间

转录组数据的相关性, 结果表明样品 K1、K2、K3 之间以及 M1、M2、M3 样品之间的相关性 R^2 均大于 0.9, 表明基因在样本间的表达量相似性高, 转录组测序数据结果可靠。

2.4 差异表达基因的筛选

克林霉素胁迫下, 嗜根考克氏菌 DC2201 中共有 1 202 个显著 DEGs ($P\text{-adjust}<0.05$, 上调 $\log_2(\text{fold change})>1$ 或下调 $\log_2(\text{fold change})<-1$), 其中有 604 个基因显著上调表达, 598 个基因显著下调表达。采用火山图和聚类热图进行可视化, 展示 DEGs 在两组样本间表达差异的倍数变化值、统计学检验值以及基因的功能分类 (图 2A、2B)。

表 2 RNA 样品分析结果

Table 2 Analysis of RNA samples

Sample name	Concentration (ng/ μ L)	Total amount (μ g)	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	RQN
K1	78.70	2.75	2.15	2.05	8.70
K2	60.90	2.13	2.05	1.82	5.90
K3	134.30	4.70	2.04	1.81	8.40
M1	53.00	1.86	2.10	2.19	10.00
M2	94.70	3.31	2.12	2.17	10.00
M3	93.90	3.29	2.10	2.21	10.00

表 3 样品测序质控统计表

Table 3 Sample sequencing quality control statistics

Sample	Raw reads	Clean reads	Error rate (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
K1	25 421 614	25 224 316	0.020	98.37	95.30
K2	32 451 124	32 179 156	0.020	98.62	95.90
K3	31 763 860	31 500 802	0.020	98.41	95.39
M1	29 617 240	29 209 256	0.020	98.56	95.77
M2	30 275 596	29 812 234	0.020	98.49	95.56
M3	27 251 730	26 832 806	0.020	98.54	95.72

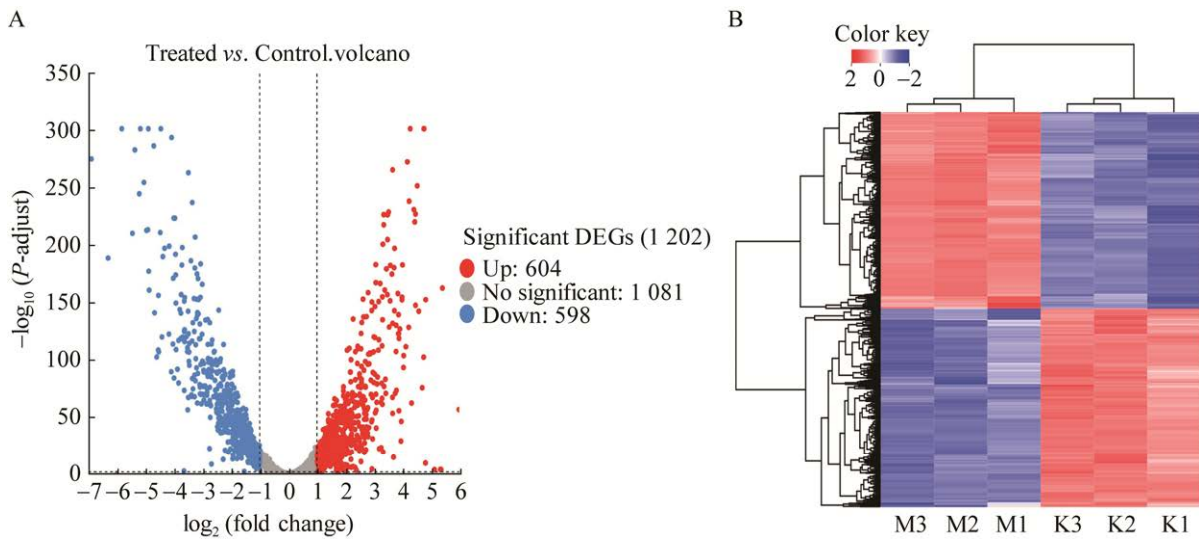


图 2 0.5 MIC 克林霉素胁迫下嗜根考克氏菌 DC2201 的基因表达

Figure 2 Gene expression of *Kocuria rhizophila* DC2201 exposed to clindamycin at 0.5 MIC. A: Volcano plot shows gene expression. Red, blue, and grey points represent up-regulated, down-regulated, and non-significant genes, respectively. B: Cluster analysis of significantly DEGs.

2.5 实时荧光定量 PCR 验证差异表达基因

为了验证克林霉素胁迫下，嗜根考克氏菌 DC2201 转录组分析结果中 DEGs 表达水平变化分析的可靠性，以 16S rRNA 为内参基因，随机挑选了 5 个 DEGs 进行实时荧光定量 PCR 分析，比较 RT-qPCR 与转录组测序结果(图 3)可知，5 个基因的表达趋势完全相同，表明转录组测序结果的准确性和可信度较高。

2.6 差异表达基因的 GO 分析

克林霉素胁迫下的嗜根考克氏菌 DC2201 中筛选得到的显著 DEGs 经 GO 注释，结果如图 4 所示。

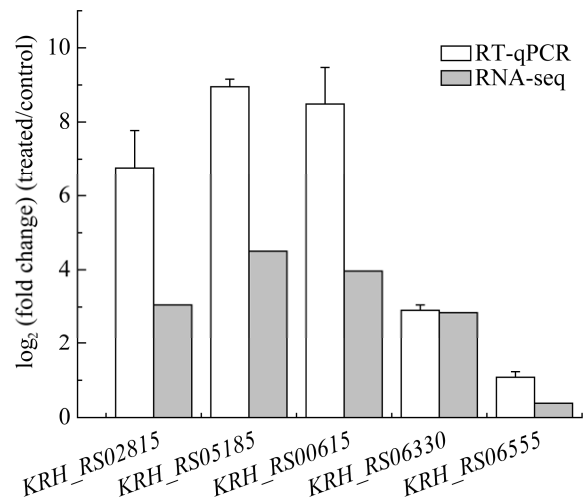


图 3 实时荧光定量 PCR 验证差异表达基因

Figure 3 Verification of DEGs by qRT-PCR.

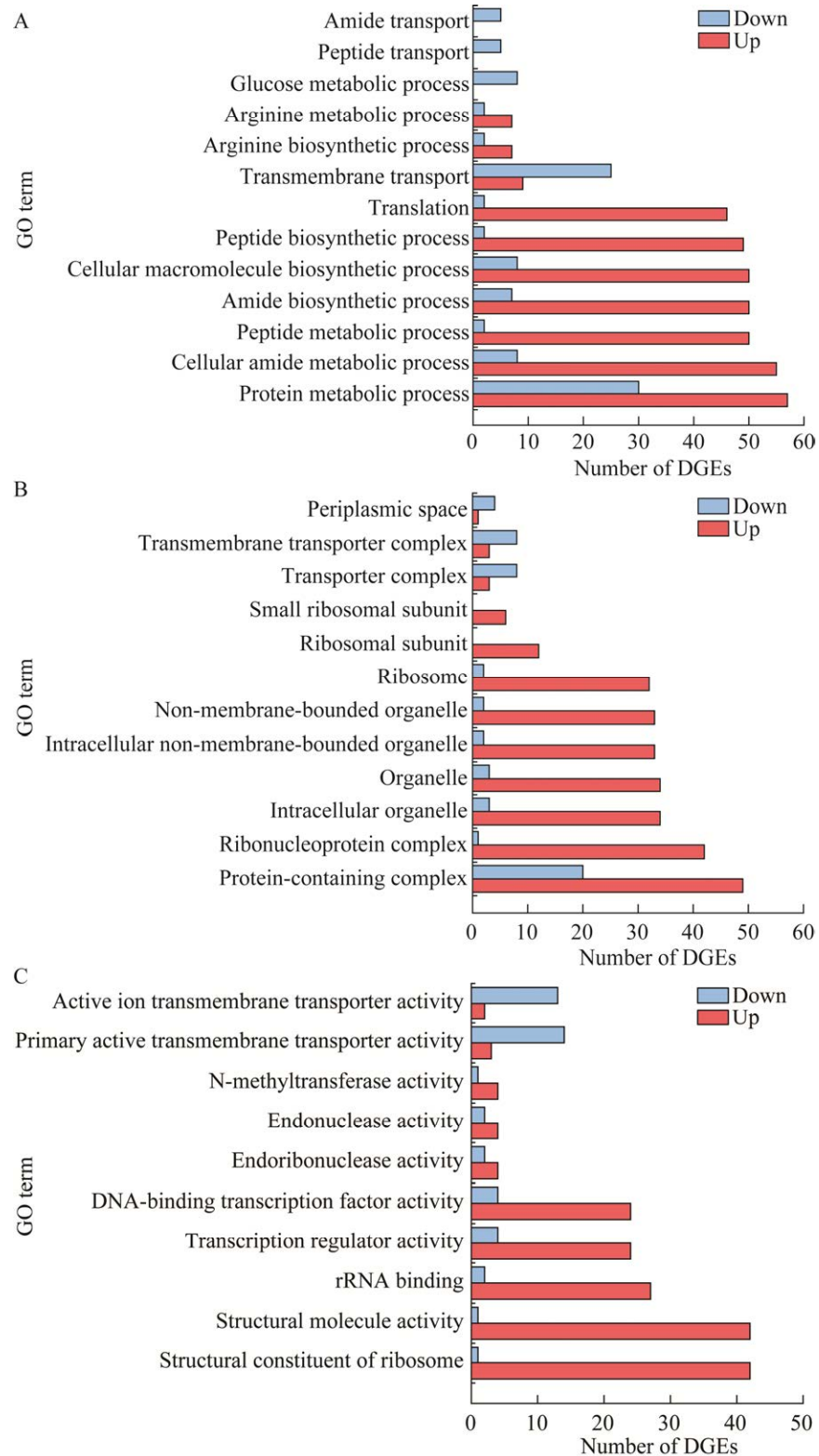


图 4 差异表达基因的 GO 注释

Figure 4 Distribution of DEGs for GO analysis. A: DEGs of biological process. B: DEGs of cellular component. C: DEGs of molecular function. Red and blue square represent up-regulated and down-regulated genes, respectively.

显著 DEGs 的 GO 注释结果分为生物学途径 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 3 类。在 BP 中注释到显著 DEGs 486 个, 其中显著上调基因 380 个, 显著下调基因 106 个。富集程度较高的显著上调表达基因主要被注释在“蛋白代谢过程 (protein metabolic process)”“细胞酰胺代谢过程 (cellular amide metabolic process)”“肽的代谢过程 (peptide metabolic processes)”“酰胺生物合成过程 (amide biosynthetic process)”“细胞大分子生物合成过程 (cellular macromolecule biosynthetic process)”“肽生物合成 (peptide biosynthetic process)”“翻译 (translation)”。显著下调表达基因主要富集在“蛋白代谢过程 (protein metabolic process)”“跨膜运输 (transmembrane transport)”, 如图 4A 所示。在 CC 中注释到显著 DEGs 335 个, 其中显著上调表达基因 282 个, 显著下调表达基因 53 个。富集程度较高的显著上调表达基因主要与“含蛋白复合体 (protein-containing complex)”“核糖核蛋白复合体 (ribonucleoprotein complex)”“细胞器 (organelle)”“核糖体 (ribosome)”有关。显著下调表达基因主要与“含蛋白复合体 (protein-containing complex)”“转运体复合物 (transporter complex)”以及“跨膜转运体复合物 (transmembrane transporter complex)”有关, 如图 4B 所示。此外, 在 MF 中注释到显著 DEGs 220 个, 其中显著上调表达基因 176 个, 显著下调表达基因 44 个。富集程度较高的显著上调表达基因被注释在“核糖体结构单元 (structural constituent of ribosome)”“结构分子活性 (structural molecule activity)”“rRNA 结合 (rRNA binding)”“转录调控因子活性 (transcription

regulator activity)”“DNA 结合转录因子的活性 (DNA-binding transcription factor activity)”。显著下调表达基因主要富集在“主要主动跨膜转运体活性 (primary active transmembrane transporter activity)”和“主动离子跨膜转运活性 (active ion transmembrane transporter activity)”, 如图 4C 所示。

2.7 重要差异表达基因的功能分析

在注释到的 2 283 个 DEGs 中, 除了 271 个为编码未知功能蛋白 (hypothetical protein) 的基因之外, 其余 DEGs 都注释为有明确功能的基因, 其产物中包含许多对细菌生命活动有重要功能的蛋白质, 如细菌转录因子、MFS 转运体、DNA 损伤修复等。本节仅介绍显著 DEGs 中注释到的转录因子、MFS 转运体和毒素-抗毒素 (toxin-antitoxin, TA) 系统, 其他结合 KEGG 注释进行介绍。

2.7.1 转录因子

从克林霉素胁迫下的嗜根考克氏菌 DC2201 细胞中筛选得到的 1 202 个显著 DEGs 中共注释到 23 类, 合计 52 个转录因子 (表 4), 其中只有 2 个显著下调表达, 其他 50 个均显著上调表达, 显著上调表达的转录因子基因中有 10 个属于 TetR/AcrR 家族, 9 个属于 MarR 家族转录因子。

2.7.2 MFS 转运体

克林霉素胁迫下, 嗜根考克氏菌 DC2201 中 MFS 转运体相关的显著 DEGs 19 个 (表 5), 包括显著上调表达基因 13 个, 显著下调表达基因 6 个。其中, 显著上调表达的基因中包括编码 MDR 家族的 MFS 转运体的基因 *KRH_RS05890* [\log_2 (fold change) 为 1.17] 和编码 DHA2 (drug: H⁺ antiporter 2, DHA2) 家族外排 MFS 转运体渗透酶亚基的基因 *KRH_RS07690* [\log_2 (fold change) 为 1.67]。

表 4 差异表达基因中注释到的转录因子统计表

Table 4 Statistics of significantly DEGs encoding transcription factors

Transcription factor family	Number of DEGs	
	Up-regulated	Down-regulated
TetR/AcrR	10	–
MarR	9	–
IclR	3	–
ArsR/SmtB	2	–
WhiB	2	–
Metal-dependent	2	–
Fur	2	–
GntR	2	–
Transcriptional regulator	2	–
TetR	2	–
Lrp/AsnC	2	–
LysR	2	–
Metal-sensitive	1	–
LacI	1	–
ROK	1	–
FmdB	1	–
DeoR/GlpR	1	–
XRE	1	–
CarD	1	–
Rrf2	1	–
PucR	1	–
Crp/Fnr	1	–
Response regulator	–	2

– means no data.

表 5 编码 MFS 转运体相关的差异表达基因

Table 5 Significantly DEGs encoding MFS transporters

Gene ID	Gene name	log ₂ (fold change)	Regulation	Product
KRH_RS00075	<i>KRH_RS00075</i>	4.41	Up	MFS transporter
KRH_RS11475	<i>KRH_RS11475</i>	2.19	Up	MFS transporter
KRH_RS00690	<i>KRH_RS00690</i>	2.18	Up	MFS transporter
KRH_RS03495	<i>KRH_RS03495</i>	2.02	Up	MFS transporter
KRH_RS11030	<i>KRH_RS11030</i>	1.88	Up	MFS transporter
KRH_RS09005	<i>KRH_RS09005</i>	1.77	Up	MFS transporter
KRH_RS07690	<i>KRH_RS07690</i>	1.67	Up	DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit
KRH_RS08120	<i>KRH_RS08120</i>	1.67	Up	Sugar porter family MFS transporter
KRH_RS12630	<i>KRH_RS12630</i>	1.62	Up	MFS transporter
KRH_RS08365	<i>KRH_RS08365</i>	1.54	Up	MFS transporter
KRH_RS01445	<i>KRH_RS01445</i>	1.52	Up	MFS transporter
KRH_RS00100	<i>KRH_RS00100</i>	1.35	Up	MFS transporter
KRH_RS05890	<i>KRH_RS05890</i>	1.17	Up	MDR family MFS transporter
KRH_RS00905	<i>KRH_RS00905</i>	–1.56	Down	Multidrug efflux MFS transporter
KRH_RS01120	<i>KRH_RS01120</i>	–1.63	Down	MFS transporter
KRH_RS01170	<i>KRH_RS01170</i>	–1.67	Down	MFS transporter
KRH_RS01835	<i>KRH_RS01835</i>	–2.32	Down	MFS transporter
KRH_RS00350	<i>KRH_RS00350</i>	–3.15	Down	MFS transporter
KRH_RS03220	<i>KRH_RS03220</i>	–3.24	Down	MFS transporter

2.7.3 TA 系统

TA 系统是一种广泛分布于各类细菌中的细菌防御系统^[16-17]。在克林霉素的胁迫作用下, 嗜根考克氏菌 DC2201 细胞中与 TA 系统相关的显著 DEGs 有 4 个(表 6), 而且全为显著上调表达基因, 其中包括上调最为显著、编码 RelE/ParE 家族毒素的基因 *KRH_RS00650* [\log_2 (fold change)为 4.79]。

2.8 差异表达基因的 KEGG 分析

将克林霉素胁迫下嗜根考克氏菌 DC2201 细胞中的显著 DEGs 进行 KEGG 注释。结果表

明, 在克林霉素胁迫下, 嗜根考克氏菌 DC2201 细胞的 DNA 损伤修复系统、核糖体、ABC 转运蛋白、碳水化合物代谢、肽聚糖的生物合成等代谢途径均发生变化。

2.8.1 DNA 损伤修复

克林霉素胁迫处理下嗜根考克氏菌 DC2201 细胞显著 DEGs 中有 16 个与 DNA 的错配修复、碱基切除修复、核苷酸切除修复和同源重组修复等 DNA 修复途径相关(表 7), 其中 13 个基因显著上调, 3 个基因显著下调。显著上调表达的基因包括编码同时具有 DNA-糖基化酶和 DNA-AP

表 6 编码毒素-抗毒素系统的差异表达基因

Table 6 Significantly DEGs encoding toxin-antitoxin system

Gene ID	Gene name	\log_2 (fold change)	Regulation	Product
KRH_RS00650	<i>KRH_RS00650</i>	4.79	Up	Type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin
KRH_RS10555	<i>KRH_RS10555</i>	3.67	Up	Type IV toxin-antitoxin system AbiEi family antitoxin
KRH_RS00645	<i>KRH_RS00645</i>	3.17	Up	Type II toxin-antitoxin system prevent-host-death family antitoxin
KRH_RS12145	<i>KRH_RS12145</i>	1.76	Up	Type II toxin-antitoxin system death-on-curing family toxin

表 7 与 DNA 损伤修复相关的显著差异表达基因

Table 7 Significantly DEGs associated with DNA damage repair

Gene ID	Gene name	\log_2 (fold change)	Regulation	Product
KRH_RS11540	<i>KRH_RS11540</i>	4.20	Up	Single-stranded DNA-binding protein
KRH_RS01360	<i>KRH_RS01360</i>	2.85	Up	DNA polymerase III subunit gamma and tau
KRH_RS04165	<i>KRH_RS04165</i>	2.77	Up	ATP-dependent helicase
KRH_RS04860	<i>KRH_RS04860</i>	2.72	Up	3'→5' exonuclease
KRH_RS06410	<i>holA</i>	2.35	Up	DNA polymerase III subunit delta
KRH_RS05310	<i>ssb</i>	1.87	Up	Single-stranded DNA-binding protein
KRH_RS05090	<i>mutM</i>	1.58	Up	Bifunctional DNA-formamidopyrimidine glycosylase/DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase
KRH_RS02015	<i>KRH_RS02015</i>	1.44	Up	DNA-3-methyladenine glycosylase I
KRH_RS02215	<i>nth</i>	1.41	Up	Endonuclease III
KRH_RS03810	<i>KRH_RS03810</i>	1.19	Up	Mismatch-specific DNA-glycosylase
KRH_RS01670	<i>KRH_RS01670</i>	1.18	Up	DNA-3-methyladenine glycosylase I
KRH_RS07615	<i>KRH_RS07615</i>	1.14	Up	DNA-3-methyladenine glycosylase
KRH_RS06330	<i>recO</i>	1.11	Up	DNA repair protein RecO
KRH_RS01355	<i>recR</i>	-1.37	Down	Recombination mediator RecR
KRH_RS06680	<i>ruvB</i>	-1.47	Down	Holliday junction branch migration DNA helicase RuvB
KRH_RS06685	<i>ruvA</i>	-1.99	Down	Holliday junction branch migration protein RuvA

裂解酶双功能的基因 *mutM* [\log_2 (fold change)为 1.58]、编码核酸内切酶 III 的基因 *nth* [\log_2 (fold change)为 1.41]、编码 3'→5'核酸外切酶的基因 *KRH_RS04860* [\log_2 (fold change)为 2.72]、编码 DNA 糖基化酶的基因 *KRH_RS01670* [\log_2 (fold change)为 1.18]和 *KRH_RS07615* [\log_2 (fold change)为 1.14]、编码 DNA 修复蛋白的基因 *recO* [\log_2 (fold change)为 1.11]。

2.8.2 核糖体

克林霉素的胁迫处理导致嗜根考克氏菌 DC2201 中核糖体途径相关的显著 DEGs 达到 43 个(表 8), 其中 42 个基因显著上调, 1 个基因显著下调。其中, 编码 50S 核糖体蛋白 L19 和编码 30S 核糖体蛋白 S12 的两个基因 *rpIS* [\log_2 (fold change)为 4.79]和 *rpsL* [\log_2 (fold change)为 4.38]的上调效果最为显著, 而显著下调的基因为 *ykgO* [\log_2 (fold change)为-1.55], 编码 50S 核糖体蛋白 L36。

另外, 在显著 DEGs 中发现编码核糖体亚基组装以及起始翻译新的蛋白质所必需的 3 个转录起始因子的基因 *infA*、*infB*、*infC* 也显著上调。

2.8.3 ABC 转运蛋白

克林霉素的胁迫处理导致嗜根考克氏菌 DC2201 的 ABC 转运蛋白相关的显著 DEGs 有 28 个(表 9), 其中 7 个基因显著上调, 21 个基因显著下调。上调表达最为显著的 2 个基因为 *KRH_RS00615* [\log_2 (fold change)为 3.97]和 *KRH_RS00605* [\log_2 (fold change)为 2.68], 分别编码金属 ABC 转运蛋白底物结合蛋白和金属 ABC 转运蛋白渗透酶。同时, 编码铁转运体渗透酶的基因 *KRH_RS05450* [\log_2 (fold change)为 1.18]也显著上调。下调最为显著的 3 个基因分别是 *ugpC* [\log_2 (fold change)为 -5.83]、*KRH_RS01800* [\log_2 (fold change)为 -5.46]和

KRH_RS01805 [\log_2 (fold change)为-4.89], 它们分别编码 sn-甘油-3-磷酸 ABC 转运蛋白 ATP 结合蛋白、碳水化合物 ABC 转运蛋白渗透酶和糖 ABC 转运蛋白渗透酶, 下调基因中还包括磷酸盐特殊转运系统(phosphate specific transport, Pst)中的 3 个关键基因 *pstA* [\log_2 (fold change)为-1.45], *pstB* [\log_2 (fold change)为-1.61]和 *pstS* [\log_2 (fold change)为-1.25]。

2.8.4 碳水化合物代谢

克林霉素的胁迫处理导致嗜根考克氏菌 DC2201 中与戊糖磷酸途径、糖酵解、三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环、淀粉与蔗糖、丙酮酸、丁酸等碳水化合物代谢相关的显著 DEGs 达到 77 个, 其中仅有 5 个基因显著上调, 72 个基因显著下调(表 10)。例如, 编码糖酵解途径中限速酶 6-磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶的基因 *KRH_RS02780* [\log_2 (fold change)为-2.21]和 *pyk* [\log_2 (fold change)为-1.75]以及编码 TCA 循环中限速酶柠檬酸合酶基因 *KRH_RS03990* [\log_2 (fold change)为-1.38]都表现为显著下调。同时, 编码琥珀酸脱氢酶基因 *KRH_RS03635* [\log_2 (fold change)为-4.90]也显著下调。

2.8.5 肽聚糖合成

KEGG 注释发现, 克林霉素的胁迫处理导致嗜根考克氏菌 DC2201 肽聚糖合成相关的显著 DEGs 有 5 个(表 11), 其中显著上调基因 2 个, 显著下调基因 3 个。显著下调基因都是肽聚糖生物合成的关键基因, 分别为编码磷酸-N-乙酰胞壁氨酰五肽转移酶基因 *mraY* [\log_2 (fold change)为-1.09]、编码 D-丙氨酰-D-丙氨酸羧肽酶基因 *KRH_RS11780* [\log_2 (fold change)为-1.06]、编码含青霉素结合转肽酶结构域的蛋白质的基因 *KRH_RS10210* [\log_2 (fold change)为-3.48]。

表 8 核糖体代谢相关的显著差异表达基因

Table 8 Significantly DEGs related to ribosomal metabolic pathway

Gene ID	Gene name	log ₂ (fold change)	Regulation	Product
KRH_RS05180	<i>rplS</i>	4.79	Up	50S ribosomal protein L19
KRH_RS02950	<i>rpsL</i>	4.38	Up	30S ribosomal protein S12
KRH_RS03095	<i>rpmJ</i>	3.73	Up	50S ribosomal protein L36
KRH_RS03125	<i>rplM</i>	3.70	Up	50S ribosomal protein L13
KRH_RS03025	<i>rplN</i>	3.64	Up	50S ribosomal protein L14
KRH_RS11635	<i>rpmH</i>	3.64	Up	50S ribosomal protein L34
KRH_RS03105	<i>rpsK</i>	3.34	Up	30S ribosomal protein S11
KRH_RS03100	<i>rpsM</i>	3.26	Up	30S ribosomal protein S13
KRH_RS06405	<i>rpsT</i>	3.02	Up	30S ribosomal protein S20
KRH_RS02875	<i>rplJ</i>	2.73	Up	50S ribosomal protein L10
KRH_RS03130	<i>rpsI</i>	2.70	Up	30S ribosomal protein S9
KRH_RS05080	<i>rpmF</i>	2.66	Up	50S ribosomal protein L32
KRH_RS02955	<i>rpsG</i>	2.57	Up	30S ribosomal protein S7
KRH_RS07710	<i>rpmI</i>	2.48	Up	50S ribosomal protein L35
KRH_RS02970	<i>rpsJ</i>	2.44	Up	30S ribosomal protein S10
KRH_RS01735	<i>rpmB</i>	2.38	Up	50S ribosomal protein L28
KRH_RS08000	<i>rpsB</i>	2.32	Up	30S ribosomal protein S2
KRH_RS05505	<i>rplU</i>	2.25	Up	50S ribosomal protein L21
KRH_RS01740	<i>rpmG</i>	2.16	Up	50S ribosomal protein L33
KRH_RS02975	<i>rplC</i>	2.11	Up	50S ribosomal protein L3
KRH_RS08465	<i>KRH_RS08465</i>	2.09	Up	50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc
KRH_RS03030	<i>rplX</i>	2.05	Up	50S ribosomal protein L24
KRH_RS03020	<i>rpsQ</i>	1.98	Up	30S ribosomal protein S17
KRH_RS07705	<i>rplT</i>	1.98	Up	50S ribosomal protein L20
KRH_RS11545	<i>rpsF</i>	1.96	Up	30S ribosomal protein S6
KRH_RS03060	<i>rpmD</i>	1.91	Up	50S ribosomal protein L30
KRH_RS06605	<i>rpsD</i>	1.88	Up	30S ribosomal protein S4
KRH_RS05160	<i>rpsP</i>	1.87	Up	30S ribosomal protein S16
KRH_RS03115	<i>rplQ</i>	1.86	Up	50S ribosomal protein L17
KRH_RS05510	<i>rpmA</i>	1.77	Up	50S ribosomal protein L27
KRH_RS03065	<i>rplO</i>	1.76	Up	50S ribosomal protein L15
KRH_RS03035	<i>rplE</i>	1.70	Up	50S ribosomal protein L5
KRH_RS03015	<i>rpmC</i>	1.68	Up	50S ribosomal protein L29
KRH_RS03050	<i>rplR</i>	1.56	Up	50S ribosomal protein L18
KRH_RS03000	<i>rplV</i>	1.48	Up	50S ribosomal protein L22
KRH_RS03045	<i>rplF</i>	1.45	Up	50S ribosomal protein L6
KRH_RS01745	<i>rpsN</i>	1.43	Up	30S ribosomal protein S14
KRH_RS03010	<i>rplP</i>	1.41	Up	50S ribosomal protein L16
KRH_RS02995	<i>rpsS</i>	1.30	Up	30S ribosomal protein S19
KRH_RS05825	<i>rpsA</i>	1.30	Up	30S ribosomal protein S1
KRH_RS03040	<i>rpsH</i>	1.21	Up	30S ribosomal protein S8
KRH_RS03055	<i>rpsE</i>	1.21	Up	30S ribosomal protein S5
KRH_RS11430	<i>ykgO</i>	-1.55	Down	Type B 50S ribosomal protein L36

表 9 编码 ABC 转运蛋白相关的显著差异表达基因
Table 9 Significantly DEGs encoding ABC transporters

Gene ID	Gene name	log ₂ (fold change)	Regulation	Product
KRH_RS00615	<i>KRH_RS00615</i>	3.97	Up	Metal ABC transporter substrate-binding protein
KRH_RS00605	<i>KRH_RS00605</i>	2.68	Up	Metal ABC transporter permease
KRH_RS07950	<i>KRH_RS07950</i>	2.19	Up	MetQ/NlpA family ABC transporter substrate-binding protein
KRH_RS07945	<i>KRH_RS07945</i>	1.41	Up	Methionine ABC transporter ATP-binding protein
KRH_RS07940	<i>KRH_RS07940</i>	1.35	Up	ABC transporter permease
KRH_RS05440	<i>KRH_RS05440</i>	1.30	Up	ABC transporter substrate-binding protein
KRH_RS05450	<i>KRH_RS05450</i>	1.18	Up	Iron ABC transporter permease
KRH_RS09440	<i>pstS</i>	-1.25	Down	Phosphate ABC transporter substrate-binding protein PstS
KRH_RS09430	<i>pstA</i>	-1.45	Down	Phosphate ABC transporter permease PstA
KRH_RS06050	<i>KRH_RS06050</i>	-1.52	Down	Biotin transporter BioY
KRH_RS09425	<i>pstB</i>	-1.61	Down	Phosphate ABC transporter ATP-binding protein PstB
KRH_RS00505	<i>KRH_RS00505</i>	-1.70	Down	Amino acid ABC transporter ATP-binding protein
KRH_RS00180	<i>KRH_RS00180</i>	-1.90	Down	ABC transporter permease
KRH_RS00510	<i>KRH_RS00510</i>	-2.21	Down	Amino acid ABC transporter permease
KRH_RS09115	<i>KRH_RS09115</i>	-2.24	Down	ABC transporter ATP-binding protein
KRH_RS03895	<i>KRH_RS03895</i>	-2.50	Down	ABC transporter permease
KRH_RS00185	<i>KRH_RS00185</i>	-2.61	Down	ABC transporter permease
KRH_RS01810	<i>KRH_RS01810</i>	-2.79	Down	Extracellular solute-binding protein
KRH_RS10405	<i>KRH_RS10405</i>	-3.54	Down	ABC transporter ATP-binding protein
KRH_RS03890	<i>KRH_RS03890</i>	-3.57	Down	ABC transporter permease
KRH_RS10395	<i>KRH_RS10395</i>	-3.63	Down	ABC transporter permease
KRH_RS03885	<i>KRH_RS03885</i>	-3.65	Down	ABC transporter family substrate-binding protein
KRH_RS00190	<i>KRH_RS00190</i>	-3.94	Down	ABC transporter substrate-binding protein
KRH_RS10390	<i>KRH_RS10390</i>	-4.00	Down	ABC transporter substrate-binding protein
KRH_RS10400	<i>KRH_RS10400</i>	-4.18	Down	ABC transporter permease
KRH_RS01805	<i>KRH_RS01805</i>	-4.89	Down	Sugar ABC transporter permease
KRH_RS01800	<i>KRH_RS01800</i>	-5.46	Down	Carbohydrate ABC transporter permease
KRH_RS01795	<i>ugpC</i>	-5.83	Down	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter ATP-binding protein UgpC

表 10 碳水化合物代谢相关的显著差异表达基因

Table 10 Significantly DEGs related to carbohydrate metabolism pathway

Gene ID	Gene name	log ₂ (fold change)	Regulation	Product
KRH_RS12530	<i>KRH_RS12530</i>	4.72	Up	Pyruvate kinase
KRH_RS12535	<i>KRH_RS12535</i>	3.31	Up	Hypothetical protein
KRH_RS04945	<i>KRH_RS04945</i>	1.52	Up	Acetolactate synthase large subunit
KRH_RS06335	<i>leuA</i>	1.39	Up	2-isopropylmalate synthase
KRH_RS01730	<i>malQ</i>	1.34	Up	4-alpha-glucanotransferase
KRH_RS01960	<i>KRH_RS01960</i>	-1.01	Down	D-hexose-6-phosphate mutarotase
KRH_RS00255	<i>KRH_RS00255</i>	-1.08	Down	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
KRH_RS09625	<i>KRH_RS09625</i>	-1.11	Down	Thiamine pyrophosphate-binding protein
KRH_RS09340	<i>deoC</i>	-1.18	Down	Deoxyribose-phosphate aldolase
KRH_RS05935	<i>KRH_RS05935</i>	-1.19	Down	Phosphoglycerate kinase
KRH_RS08815	<i>KRH_RS08815</i>	-1.20	Down	Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor subunit
KRH_RS09140	<i>otsB</i>	-1.26	Down	Trehalose-phosphatase
KRH_RS09820	<i>KRH_RS09820</i>	-1.27	Down	NAD(P)-dependent alcohol dehydrogenase
KRH_RS01140	<i>KRH_RS01140</i>	-1.36	Down	CoA transferase subunit B
KRH_RS03990	<i>KRH_RS03990</i>	-1.38	Down	Citrate synthase
KRH_RS08655	<i>KRH_RS08655</i>	-1.44	Down	Pyruvate dehydrogenase
KRH_RS02470	<i>KRH_RS02470</i>	-1.45	Down	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase family protein
KRH_RS09135	<i>KRH_RS09135</i>	-1.49	Down	Trehalose-6-phosphate synthase
KRH_RS00105	<i>KRH_RS00105</i>	-1.50	Down	Thiamine pyrophosphate-binding protein
KRH_RS05275	<i>KRH_RS05275</i>	-1.52	Down	ROK family protein
KRH_RS08820	<i>sdhA</i>	-1.57	Down	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
KRH_RS05940	<i>tpiA</i>	-1.65	Down	Triose-phosphate isomerase
KRH_RS05930	<i>gap</i>	-1.71	Down	Type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
KRH_RS10705	<i>KRH_RS10705</i>	-1.72	Down	NAD-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase
KRH_RS04505	<i>KRH_RS04505</i>	-1.74	Down	Sugar phosphate nucleotidyltransferase
KRH_RS05800	<i>pyk</i>	-1.75	Down	Pyruvate kinase
KRH_RS07190	<i>gndA</i>	-1.82	Down	NADP-dependent phosphogluconate dehydrogenase
KRH_RS00715	<i>pta</i>	-1.89	Down	Phosphate acetyltransferase
KRH_RS06235	<i>glgA</i>	-1.98	Down	Glycogen synthase
KRH_RS03335	<i>galU</i>	-2.00	Down	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase GalU
KRH_RS09210	<i>glgP</i>	-2.03	Down	Alpha-glucan family phosphorylase
KRH_RS09205	<i>KRH_RS09205</i>	-2.03	Down	Alpha-1,4-glucan-maltose-1-phosphate maltosyltransferase
KRH_RS04565	<i>KRH_RS04565</i>	-2.04	Down	Multifunctional oxoglutarate decarboxylase/oxoglutarate dehydrogenase thiamine pyrophosphate-binding subunit/dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase subunit
KRH_RS00820	<i>KRH_RS00820</i>	-2.06	Down	Enoyl-CoA hydratase
KRH_RS09750	<i>KRH_RS09750</i>	-2.08	Down	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
KRH_RS07060	<i>lpdA</i>	-2.18	Down	Dihydrolipoyl dehydrogenase
KRH_RS03875	<i>KRH_RS03875</i>	-2.18	Down	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase

(待续)

(续表 10)

Gene ID	Gene name	log ₂ (fold change)	Regulation	Product
KRH_RS02780	<i>KRH_RS02780</i>	-2.21	Down	6-phosphofructokinase
KRH_RS09640	<i>KRH_RS09640</i>	-2.22	Down	NAD-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase
KRH_RS02430	<i>KRH_RS02430</i>	-2.31	Down	L-lactate dehydrogenase
KRH_RS05975	<i>tkt</i>	-2.32	Down	Transketolase
KRH_RS08320	<i>KRH_RS08320</i>	-2.38	Down	Aldehyde dehydrogenase family protein
KRH_RS01580	<i>KRH_RS01580</i>	-2.41	Down	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)
KRH_RS08940	<i>sucD</i>	-2.49	Down	Succinate-CoA ligase subunit alpha
KRH_RS05950	<i>pgl</i>	-2.50	Down	6-phosphogluconolactonase
KRH_RS03670	<i>adhP</i>	-2.52	Down	Alcohol dehydrogenase AdhP
KRH_RS06230	<i>glgC</i>	-2.59	Down	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase
KRH_RS08480	<i>KRH_RS08480</i>	-2.62	Down	Ribose-phosphate diphosphokinase
KRH_RS04910	<i>KRH_RS04910</i>	-2.67	Down	Malate:quinone oxidoreductase
KRH_RS05965	<i>KRH_RS05965</i>	-2.72	Down	Glucose-6-phosphate isomerase
KRH_RS01145	<i>KRH_RS01145</i>	-2.75	Down	Acetyl-CoA C-acetyltransferase
KRH_RS05960	<i>zwf</i>	-2.79	Down	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
KRH_RS03180	<i>treZ</i>	-2.82	Down	Malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase
KRH_RS07065	<i>sucB</i>	-2.84	Down	2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase
KRH_RS01285	<i>KRH_RS01285</i>	-2.89	Down	Alcohol dehydrogenase
KRH_RS05255	<i>aceE</i>	-2.92	Down	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring), homodimeric type
KRH_RS05970	<i>tal</i>	-2.95	Down	Transaldolase
KRH_RS08650	<i>KRH_RS08650</i>	-3.15	Down	Class II fumarate hydratase
KRH_RS09645	<i>gabT</i>	-3.17	Down	4-aminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase
KRH_RS09195	<i>glgB</i>	-3.18	Down	1,4-alpha-glucan branching protein GlgB
KRH_RS07385	<i>KRH_RS07385</i>	-3.20	Down	Pyruvate carboxylase
KRH_RS00710	<i>KRH_RS00710</i>	-3.22	Down	Acetate kinase
KRH_RS06935	<i>acnA</i>	-3.28	Down	Aconitate hydratase AcnA
KRH_RS02210	<i>acs</i>	-3.29	Down	Acetate-CoA ligase
KRH_RS08825	<i>KRH_RS08825</i>	-3.34	Down	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit
KRH_RS00880	<i>KRH_RS00880</i>	-3.34	Down	AMP-binding protein
KRH_RS09660	<i>pgm</i>	-3.37	Down	Alpha-D-glucose phosphate-specific phosphoglucomutase
KRH_RS11240	<i>KRH_RS11240</i>	-3.73	Down	ATP-grasp domain-containing protein
KRH_RS11150	<i>KRH_RS11150</i>	-3.88	Down	2,3-butanediol dehydrogenase
KRH_RS00935	<i>fbaA</i>	-3.94	Down	Class II fructose-bisphosphate aldolase
KRH_RS09200	<i>treS</i>	-3.97	Down	Maltose alpha-D-glucosyltransferase
KRH_RS08770	<i>eno</i>	-4.04	Down	Phosphopyruvate hydratase
KRH_RS03630	<i>KRH_RS03630</i>	-4.09	Down	Fumarate reductase/succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
KRH_RS09265	<i>KRH_RS09265</i>	-4.17	Down	Phosphoglyceromutase
KRH_RS03625	<i>KRH_RS03625</i>	-4.33	Down	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase iron-sulfur subunit
KRH_RS03635	<i>KRH_RS03635</i>	-4.90	Down	Succinate dehydrogenase cytochrome b subunit
KRH_RS09635	<i>KRH_RS09635</i>	-5.37	Down	NAD-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase

表 11 肽聚糖合成相关的显著差异表达基因

Table 11 Significantly DEGs related to peptidoglycan biosynthesis

Gene ID	Gene name	log ₂ (fold change)	Regulation	Product
KRH_RS07305	<i>KRH_RS07305</i>	2.49	Up	Penicillin-binding protein 2
KRH_RS07300	<i>KRH_RS07300</i>	1.56	Up	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase
KRH_RS11780	<i>KRH_RS11780</i>	-1.06	Down	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family protein
KRH_RS07290	<i>mraY</i>	-1.09	Down	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase
KRH_RS10210	<i>KRH_RS10210</i>	-3.48	Down	Penicillin-binding transpeptidase domain-containing protein

3 讨论与结论

细菌在 DNA 损伤、强酸强碱、极端高温、营养饥饿、强氧化还原电势、高渗透以及抗生素等胁迫条件下, 会被诱导发生特定的应激反应, 如改变细胞的特定结构、调节自身的代谢、激活毒力潜力和激发抗生素耐药性(诱导耐药突变或刺激耐药机制)等, 以降低对不利环境的敏感性^[18-19]。抗生素等抗菌药物的微生物检验通常依赖于质控菌株对药物的敏感性, 而细菌对抗生素等抗菌药物的应激反应对抗生素检验的准确性、治疗的疗效以及临床应用都有重要影响^[19]。因此, 药物对微生物生长的影响, 以及微生物对抗生素等抗菌药物的耐药性研究一直都是药物微生物学研究领域的重点和热点^[20-22]。嗜根考克氏菌 DC2201 是一株常用于抗生素药效试验的质控菌株, 本研究以克林霉素为例, 采用转录组学方法揭示了嗜根考克氏菌 DC2201 对抗生素胁迫的响应机制, 其结果对揭示嗜根考克氏菌 DC2201 对抗菌药物的敏感性和耐药机制都具有重要意义。

转录因子在细菌的生长发育以及响应逆境胁迫中具有重要作用, 它通过传递和放大胁迫信号, 介导相关基因的表达调控^[23-24]。本研究通过转录组学方法筛选到抗生素胁迫下嗜根考克氏菌 DC2201 细胞中合计 52 个转录因子家族基因表达水平发生显著变化(表 4), 最终导致

1 202 个基因显著差异表达($P\text{-adjust}<0.05$, 上调 $\log_2(\text{fold change})>1$ 或下调 $\log_2(\text{fold change})<-1$), 其中有 604 个基因显著上调表达, 598 个基因显著下调表达, 这一结果表明抗生素克林霉素的胁迫可导致嗜根考克氏菌 DC2201 基因表达的全局调控作用。

MFS 转运体是一类广泛存在于生物界的膜蛋白, 主要负责包括糖、氨基酸、离子、药物等物质的跨膜转运; 研究结果表明, MDR 家族和 DHA2 家族都可通过偶联质子转运来驱动多种抗菌药物的排出^[25-26]。另外, 大肠埃希氏菌中 TetR/AcrR 家族转录因子可调节编码 MDR 外排泵 *acrAB**基因的表达, MarR 家族转录因子则是通过调节 MarA 的表达来调节编码 MDR 外排泵基因 *acrAB**和 *tolC* 的表达水平^[27]。本研究发现, 克林霉素胁迫下嗜根考克氏菌 DC2201 细胞中包括 10 个 TetR/AcrR 家族和 9 个 MarR 家族转录因子均显著上调表达(表 4), 由此可以推断, 在克林霉素的作用下, 嗜根考克氏菌 DC2201 中 TetR/AcrR 家族转录因子和 MarR 家族转录因子的显著上调表达, 可能通过调节编码 MDR 外排泵相关基因的表达, 增加药物外排家族 MFS 转运体对克林霉素的外排来响应克林霉素的胁迫。

DNA 损伤修复是生物细胞内的 DNA 分子受到损伤以后恢复结构的现象。本研究发现, 在克林霉素的胁迫下, 嗜根考克氏菌 DC2201 细胞

显著差异表达基因中有 16 个与 DNA 的错配修复、碱基切除修复、核苷酸切除修复和同源重组修复等 DNA 修复途径相关(表 7)。其中, MutM 是原核生物碱基切除修复系统中的双功能酶,不但可以识别 DNA 损伤,而且能切除损伤的碱基,从而参与到许多损伤修复过程,防止基因突变和基因组不稳定^[28-29]。Nth 酶能够修复 DNA 中由于嘧啶氧化而引起的碱基损伤,它通过切割损伤的 DNA 链,移除氧化碱基,在修复过程中合成新的 DNA 链^[30]。3'→5'核酸外切酶在 DNA 合成质量控制中具有重要的作用,此外,它们还在 DNA 复制、修复和重组过程中作为 DNA 聚合酶的校对外切酶发挥作用^[31]。DNA 糖基化酶可以去除细胞毒性和诱导 DNA 碱基变性,从而启动碱基修复途径^[32]。RecO 是一种重组介质蛋白,对细菌的同源重组、复制修复和脱氧核糖核酸退火都很重要^[33]。上述基因上调表达的结果表明,克林霉素的胁迫会导致嗜根考克氏菌 DC2201 的 DNA 损伤,嗜根考克氏菌 DC2201 通过上调与 DNA 修复相关的基因,可以加速 DNA 损伤的修复过程。

RelE/ParE 家族属于 II 型 TA 系统。ParE 是 DNA 促旋酶,会导致 DNA 断裂的积累从而抑制 DNA 的复制,而 RelE 具有核糖体依赖性 mRNA 内切酶活性,可通过切割 mRNA 来阻止核糖体的翻译^[34-35]。研究表明在稳定状态下,II 型 TA 系统中抗毒素通过蛋白质—蛋白质相互作用中和毒素^[36]。在环境胁迫下,抗毒素被 ATP 依赖性蛋白酶选择性降解,从而导致细胞生长停滞和死亡^[37]。

另外,除编码假定蛋白的基因外,本研究的显著 DEGs 中上调最为显著的基因编码核糖核酸酶 HII [\log_2 (fold change)为 5.38]。研究表明,极端嗜热古菌 *Pyrococcus abyssi* 中的核糖核酸酶 HII 可能是完成 DNA 复制和修复所必需的

酶^[38]。我们推测,核糖核酸酶 HII 的显著上调可能与 RelE/ParE 家族毒素过表达有关,因为它可能在避免由 TA 系统介导的潜在程序性 DNA 断裂和 mRNA 修复中发挥作用,并且核糖核酸酶 HII 可能作为间接的克林霉素诱导的应激反应决定因子。

核糖体是细胞中蛋白质生物合成的场所,原核生物的核糖体由 30S 和 50S 两个亚基组成,30S 亚基在蛋白质的合成中起着至关重要的作用,而 50S 亚基在蛋白质的合成延伸阶段发挥着核心作用。克林霉素属于林可酰胺类抗生素,能够与核糖体的 50S 亚基结合,从而阻止翻译^[11]。克林霉素胁迫下,KEGG 注释嗜根考克氏菌 DC2201 细胞中核糖体合成相关差异表达基因(表 8)的结果表明,嗜根考克氏菌 DC2201 需要增加核糖体蛋白的合成以及核糖体组装来弥补克林霉素与核糖体的 50S 亚基结合后导致的蛋白质合成障碍,从而响应克林霉素的胁迫。

ABC 转运蛋白是一类位于膜内的蛋白质超家族,可利用 ATP 水解的能量在细胞膜上运输各种底物,参与细胞营养吸收、解毒和免疫反应^[39-40]等重要生物学过程。本文经 KEGG 注释克林霉素胁迫下,嗜根考克氏菌 DC2201 细胞中 ABC 转运蛋白相关差异表达基因(表 9)的结果表明,嗜根考克氏菌 DC2201 对金属转运能力会增强,而对碳水化合物和磷的转运会受到抑制。研究表明,细菌中大约 30%的蛋白质需要相应金属离子的参与才能发挥诸如酶促催化、抗氧化应激和生长代谢等生物学功能^[41]。碳水化合物是细菌的主要能量来源,细菌通过代谢碳水化合物来产生能量,并用于细胞的生长和繁殖,它不仅提供细菌生长所需的能量,还为细菌合成细胞壁、核酸和蛋白质等细胞组分提供碳源。Pst 系统是磷吸收和转运的关键系统^[42],磷的吸收和转运在生物体能量代谢和细胞膜的完整性中

发挥重要作用。另外,抑制细菌蛋白质翻译的抗生素也会影响细菌中心代谢和细胞呼吸^[43-45]。上述结果表明,在克林霉素胁迫下,嗜根考克氏菌 DC2201 可通过增强自身的氧化应激来响应克林霉素的胁迫。同时,通过减少碳水化合物和磷的吸收和转运来抑制自身的能量代谢。上述分析结果解释了克林霉素胁迫下的嗜根考克氏菌 DC2201 的生长繁殖速度减缓的现象(图 1A)。

肽聚糖是革兰氏阳性细菌细胞壁的重要组成部分,对于维持细胞完整性和细胞存活都至关重要。本研究经 KEGG 注释克林霉素胁迫下的嗜根考克氏菌 DC2201 细胞中显著差异表达基因的结果(表 11)发现,与肽聚糖合成相关的显著下调基因中,磷酸-N-乙酰胞壁酰胺五肽转移酶负责形成细胞壁肽聚糖合成中的脂质 I^[46], D-丙氨酰-D-丙氨酸羧肽酶和含青霉素结合转肽酶结构域的蛋白质都是青霉素结合蛋白家族的成员,催化聚糖链的聚合和聚糖链之间的交联,是肽聚糖生物合成中的关键酶^[47-48]。本研究表明在克林霉素的胁迫下,嗜根考克氏菌 DC2201 细胞的肽聚糖生物合成会受到抑制,这也为克林霉素胁迫下的嗜根考克氏菌 DC2201 细胞表面出现明显的塌陷,以及细胞形态发生明显的形态变化(图 1B、1C)提供了依据。

总之,本研究采用转录组测序方法研究了克林霉素胁迫下嗜根考克氏菌 DC2201 的响应机制。结果表明,0.5 MIC 克林霉素的胁迫处理对嗜根考克氏菌 DC2201 的转录谱具有显著影响。嗜根考克氏菌 DC2201 通过全局性的代谢调节以响应克林霉素的胁迫。具体而言,在克林霉素胁迫下,嗜根考克氏菌 DC2201 中有 604 个基因显著上调表达,598 个基因显著下调表达。显著性 DEGs 涉及细菌转录因子、MFS 转运体等重要功能的蛋白基因,以及 ABC 转运蛋白、核糖体、碳水化合物、肽聚糖和 DNA 的损伤修复等

代谢过程。在综合分析上述显著 DEGs 功能的基础上,揭示了克林霉素的胁迫下,嗜根考克氏菌 DC2201 的响应机制是一个全局性反应机制,通过增强 MDR 家族的 MFS 转运体的表达从而增加对克林霉素的外排;增强 DNA 修复和 RNA 代谢途径,以保证基因组的稳定性和 RNA 的正常功能;增强核糖体合成途径以弥补克林霉素与自身 50S 核糖体结合后导致蛋白质合成障碍,提高蛋白质合成效率。与此同时,减少碳水化合物的吸收和转运,以抑制自身的糖酵解途径、TCA 循环和戊糖磷酸途径等能量代谢途径,减缓自身的生长速率而降低对能量的需求,相应地,嗜根考克氏菌 DC2201 的细胞壁的稳定性和也受到影响。

参考文献

- [1] LAMBERT RJW, PEARSON J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(5): 784-790.
- [2] BASU S, PAL A, DESAI PK. Quality control of culture media in a microbiology laboratory[J]. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2005, 23(3): 159-163.
- [3] LI WJ, ZHANG YQ, SCHUMANN P, CHEN HH, HOZEIN WN, TIAN XP, XU LH, JIANG CL. *Kocuria aegyptia* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a saline, alkaline desert soil in Egypt[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(4): 733-737.
- [4] PARK EJ, KIM MS, ROH SW, JUNG MJ, BAE JW. *Kocuria atrinae* sp. nov., isolated from traditional Korean fermented seafood[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(4): 914-918.
- [5] ZHOU GL, LUO XS, TANG YL, ZHANG L, YANG Q, QIU YJ, FANG CX. *Kocuria flava* sp. nov. and *Kocuria turfanensis* sp. nov., airborne actinobacteria isolated from Xinjiang, China[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(6): 1304-1307.
- [6] TVRZOVÁ L, SCHUMANN P, SEDLÁČEK I, PÁČOVÁ Z, SPRÖER C, VERBARG S, KROPPESTEDT RM. Reclassification of strain CCM

- 132, previously classified as *Kocuria varians*, as *Kocuria carniphila* sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 139-142.
- [7] CHATTOPADHYAY MK, JAGANNADHAM MV, VAIRAMANI M, SHIVAJI S. Carotenoid pigments of an Antarctic psychrotrophic bacterium *Micrococcus roseus*: temperature dependent biosynthesis, structure, and interaction with synthetic membranes[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 239(1): 85-90.
- [8] KARN SK, CHAKRABARTI SK, REDDY MS. Degradation of pentachlorophenol by *Kocuria* sp. CL2 isolated from secondary sludge of pulp and paper mill[J]. *Biodegradation*, 2011, 22(1): 63-69.
- [9] FUJITA K, HAGISHITA T, KURITA S, KAWAKURA Y, KOBAYASHI Y, MATSUYAMA A, IWAHASHI H. The cell structural properties of *Kocuria rhizophila* for aliphatic alcohol exposure[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(3): 511-518.
- [10] TAKARADA H, SEKINE M, KOSUGI H, MATSUO Y, FUJISAWA T, OMATA S, KISHI E, SHIMIZU A, TSUKATANI N, TANIKAWA S, FUJITA N, HARAYAMA S. Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(12): 4139-4146.
- [11] SPÍZEK J, REZANKA T. Lincomycin, clindamycin and their applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(4): 455-464.
- [12] 李舜岩, 李由然, 石贵阳. 地衣芽孢杆菌 9945a 转运蛋白 YdgF1 的功能鉴定[J]. *微生物学报*, 2023, 63(4): 1618-1629.
LI SY, LI YR, SHI GY. Functional characterization of the transporter YgdF1 in *Bacillus licheniformis* 9945a[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(4): 1618-1629 (in Chinese).
- [13] 杨秋玲, 王翔, 王志宏, 黄韬, 彭密军, 宁礼信. 外界因素和杜仲叶提取物对双乙酸钠的抑菌活性影响[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(2): 105-111, 118.
YANG QL, WANG X, WANG ZH, HUANG T, PENG MJ, NING LX. Effects of external factors and *Eucommia ulmoides* leaves extracts on antibacterial activity of SDA[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(2): 105-111, 118 (in Chinese).
- [14] 由凤鸣, 胡荣, 肖冲, 侯天将, 杨露. 麻黄附子细辛汤联合抗生素的体外抗肺炎链球菌作用研究[J]. *世界中医药*, 2015, 10(6): 891-894, 899.
YOU FM, HU R, XIAO C, HOU TJ, YANG L. Research on the synergistic effect of Mahuang Fuzi Xixin decoction combined with antibiotics on *Streptococcus pneumoniae*[J]. *World Chinese Medicine*, 2015, 10(6): 891-894, 899 (in Chinese).
- [15] 全国细菌耐药监测学术委员会. 全国细菌耐药监测网技术方案(2020 年版)[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(5): 560-564.
Academic committee of China antimicrobial resistance surveillance system. Technical programme of China antimicrobial resistance surveillance system, 2020 edition[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2020, 20(5): 560-564 (in Chinese).
- [16] OGURA T, HIRAGA S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983, 80(15): 4784-4788.
- [17] AIZENMAN E, ENGELBERG-KULKA H, GLASER G. An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(12): 6059-6063.
- [18] WANG DL, NING Q, DENG ZQ, ZHANG M, YOU J. Role of environmental stresses in elevating resistance mutations in bacteria: phenomena and mechanisms[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 307: 119603.
- [19] ROEMHILD R, BOLLENBACH T, ANDERSSON DI. The physiology and genetics of bacterial responses to antibiotic combinations[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20: 478-490.
- [20] FANG H, TIAN LY, YE N, ZHANG S. Alizarin enhancement of the abundance of ARGs and impacts on the microbial community in water[J]. *Water Science and Technology*, 2023, 87(9): 2250-2264.
- [21] WU JY, LIU CC, WANG R, YAN ST, CHEN BL, ZHU XY. Enhanced bacterial adhesion force by rifampicin resistance promotes microbial colonization on PE plastic compared to non-resistant biofilm formation[J]. *Water Research*, 2023, 242: 120319.
- [22] COPPOLA D, BUONOCORE C, PALISSE M, TEDESCO P, de PASCALE D. Exploring oceans for curative compounds: potential new antimicrobial and anti-virulence molecules against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Marine Drugs*, 2022, 21(1): 9.
- [23] FANG CL, ZHANG Y. Bacterial MerR family transcription regulators: activation by distortion[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2022, 54(1): 25-36.
- [24] BAKSH KA, ZAMBLE DB. Allosteric control of metal-responsive transcriptional regulators in bacteria[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(6): 1673-1684.
- [25] ZHANG R, ABDEL-MOTAAL H, ZOU Q, GUO SJ, ZHENG XT, WANG YT, ZHANG ZL, MENG L, XU T, JIANG JQ. A novel MFS-MDR transporter, MdrP, employs D223 as a key determinant in the Na⁺

- translocation coupled to norfloxacin efflux[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 955.
- [26] DU DJ, WANG KX, NEUBERGER A, van VEEN HW, POS KM, PIDDOCK LJV, LUISI BF. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(9): 523-539.
- [27] GRKOVIC S, BROWN MH, SKURRAY RA. Regulation of bacterial drug export systems[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(4): 671-701.
- [28] FROMME JC, VERDINE GL. DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(51): 51543-51548.
- [29] LANDOVÁ B, ŠILHÁN J. Conformational changes of DNA repair glycosylase MutM triggered by DNA binding[J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(18): 3032-3044.
- [30] ASPINWALL R, ROTHWELL DG, ROLDAN-ARJONA T, ANSELMINO C, WARD CJ, CHEADLE JP, SAMPSON JR, LINDAHL T, HARRIS PC, HICKSON ID. Cloning and characterization of a functional human homolog of *Escherichia coli* endonuclease III[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(1): 109-114.
- [31] SHEVELEV IV, HÜBSCHER U. The 3'-5' exonucleases[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3: 364-376.
- [32] KROKAN HE, STANDAL R, SLUPPHAUG G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA[J]. *Biochemical Journal*, 1997, 325(1): 1-16.
- [33] RYZHIKOV M, GUPTA R, GLICKMAN M, KOROLEV S. RecO protein initiates DNA recombination and strand annealing through two alternative DNA binding mechanisms[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(42): 28846-28855.
- [34] PEDERSEN K, ZAVIALOV AV, PAVLOV MY, ELF J, GERDES K, EHRENBERG M. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site[J]. *Cell*, 2003, 112(1): 131-140.
- [35] JIANG Y, POGLIANO J, HELINSKI DR, KONIECZNY I. ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 44(4): 971-979.
- [36] GALVANI C, TERRY J, ISHIGURO EE. Purification of the RelB and RelE proteins of *Escherichia coli*: RelE binds to RelB and to ribosomes[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(8): 2700-2703.
- [37] CHRISTENSEN SK, MIKKELSEN M, PEDERSEN K, GERDES K. RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(25): 14328-14333.
- [38] le LAZ S, le GOAZIOU A, HENNEKE G. Structure-specific nuclease activities of *Pyrococcus abyssi* RNase HIII[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(14): 3689-3698.
- [39] HIGGINS CF. ABC transporters: from microorganisms to man[J]. *Annual Review of Cell Biology*, 1992, 8: 67-113.
- [40] RIMONDO J, SCHULZ LM. Not just transporters: alternative functions of ABC transporters in *Bacillus subtilis* and *Listeria monocytogenes*[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 163.
- [41] ANDREINI C, BERTINI I, CAVALLARO G, HOLLIDAY GL, THORNTON JM. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles[J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008, 13(8): 1205-1218.
- [42] BROKAW AM, EIDE BJ, MURADIAN M, BOSTER JM, TISCHLER AD. *Mycobacterium smegmatis* PhoU proteins have overlapping functions in phosphate signaling and are essential[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2523.
- [43] LOBRITZ MA, BELENKY P, PORTER CBM, GUTIERREZ A, YANG JH, SCHWARZ EG, DWYER DJ, KHALIL AS, COLLINS JJ. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(27): 8173-8180.
- [44] LIN XM, KANG LQ, LI H, PENG XX. Fluctuation of multiple metabolic pathways is required for *Escherichia coli* in response to chlortetracycline stress[J]. *Molecular BioSystems*, 2014, 10(4): 901-908.
- [45] LI LP, HASSAN KA, TETU SG, NAIDU V, POKHREL A, CAIN AK, PAULSEN IT. The transcriptomic signature of tigecycline in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 565438.
- [46] LLOYD AJ, BRANDISH PE, GILBEY AM, BUGG TD. Phospho-N-acetyl-muramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*: catalytic role of conserved aspartic acid residues[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(6): 1747-1757.
- [47] RIOSEAS B, YAGÜE P, LÓPEZ-GARCÍA MT, GONZALEZ-QUINONEZ N, BINDA E, MARINELLI F, MANTECA A. Characterization of SCO4439, a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase involved in spore cell wall maturation, resistance, and germination in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21659.
- [48] SAUVAGE E, KERFF F, TERRAK M, AYALA JA, CHARLIER P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(2): 234-258.