

研究报告

羊种布鲁氏菌链霉素耐受基因筛选及鉴定

周师众^{#1}, 袁雅琴^{#1,2}, 宁文晴^{1,3}, 薛天骐², 杨晓雯^{*1}, 丁家波^{*1}

- 1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 农业农村部动物生物安全风险预警及防控重点实验室(北方), 北京 100193
- 2 扬州大学 兽医学院 禽类预防医学教育部重点实验室 江苏省动物预防医学重点实验室, 江苏 扬州 225009
- 3 山东农业大学 动物医学院, 山东 泰安 271018

周师众, 袁雅琴, 宁文晴, 薛天骐, 杨晓雯, 丁家波. 羊种布鲁氏菌链霉素耐受基因筛选及鉴定[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 690-702.

ZHOU Shizhong, YUAN Yaqin, NING Wenqing, XUE Tianqi, YANG Xiaowen, DING Jiabo. Screening and identification of genes associated with streptomycin resistance in *Brucella melitensis*[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 690-702.

摘要:【背景】布鲁氏菌(*Brucella* spp.)是一种兼性胞内寄生菌,能够引起世界范围内的人兽共患流行病——布鲁氏菌病(以下简称布病)。链霉素是治疗布病的推荐药物,但我国已有链霉素耐受分离株(根据 CLSI 推荐的耐药折点)。【目的】筛选并鉴定羊种布鲁氏菌(*Brucella melitensis*)链霉素耐受的新基因。【方法】利用转录组筛选羊种布鲁氏菌链霉素耐受新基因,并利用同源重组、分子对接等技术预测并鉴定相关基因的功能。【结果】羊种布鲁氏菌(M5 疫苗株)在含 2×MIC 浓度链霉素培养基上,12 h 后通过耐受恢复增殖能力。转录组分析表明,细胞膜组成成分在低浓度链霉素耐受中发挥重要作用,核糖体通路相关基因表达量显著性增加[$|\log_2FC| \geq 2.0, P < 0.05$],群体感应通路、IV型分泌系统相关基因表达量显著性降低[$|\log_2FC| \geq 2.0, P < 0.05$]。利用同源重组技术缺失组成IV型分泌系统的元件,发现缺失 *virB3* 和 *virB5* 基因后,M5 疫苗株链霉素 MIC 值增高,回补后与亲本株差异不显著。分子对接预测发现,VirB3 和 VirB5 能够通过氢键与链霉素结合。【结论】链霉素主要影响羊种布鲁氏菌细胞膜组分涉及的相关通路。羊种布鲁氏菌通过降低IV型分泌系统组成元件 *virB3* 和 *virB5* 基因的表达耐受链霉素。本研究为布鲁氏菌耐药株研究提供了新思路,为布鲁氏菌新药研发提供了候选靶点。

关键词: 羊种布鲁氏菌; 链霉素; IV型分泌系统; VirB 操纵子

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2023-YWF-ZYSQ-09); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-CSLPDPCP-202403)

This work was supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (2023-YWF-ZYSQ-09) and the Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-CSLPDPCP-202403).

*These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: YANG Xiaowen, yangxiaowen01@caas.cn; DING Jiabo, dingjiabo@126.com

Received: 2024-08-22; Accepted: 2024-10-21; Published online: 2024-11-18

Screening and identification of genes associated with streptomycin resistance in *Brucella melitensis*

ZHOU Shizhong^{#1}, YUAN Yaqin^{#1,2}, NING Wenqing^{1,3}, XUE Tianqi², YANG Xiaowen^{*1}, DING Jiabo^{*1}

1 Key Laboratory of Animal Biosafe Risk Prevention and Control (North), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2 Key Laboratory for Avian Preventive Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Jiangsu Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

3 College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

Abstract: [Background] *Brucella* spp. are facultative intracellular pathogens causing a worldwide zoonosis, brucellosis. Streptomycin is the recommended antibiotic for treating brucellosis, while streptomycin-resistant isolates have been identified in China (according to the breakpoint recommended by CLSI). [Objective] To screen and identify new genes associated with streptomycin resistance in *Brucella melitensis*. [Methods] We employed RNA sequencing (RNA-seq) to mine new genes associated with streptomycin resistance in *B. melitensis*. Homologous recombination and molecular docking were employed to predict and identify the functions of the relevant genes. [Results] *B. melitensis* M5 restored its proliferation after 12 h of culture in the medium supplemented with 2×MIC of streptomycin. The results of RNA-seq revealed that cell membrane components played a role in the resistance to low-concentration streptomycin. Under streptomycin stress, the expression of genes involved in the ribosome pathway was up-regulated [$|\log_2FC| \geq 2.0$, $P < 0.05$], while that of genes involved in quorum sensing and type IV secretion system was down-regulated ($|\log_2FC| \geq 2.0$, $P < 0.05$). The MICs of streptomycin for *virB3*- and *virB5*-deleted strains were higher than that for M5, while the MICs of streptomycin for complemented strains were not significantly different from that for the wild-type strain. Molecular docking results demonstrated that VirB3 and VirB5 could bind to streptomycin through hydrogen bond. [Conclusion] Streptomycin mainly affected pathways related to cell membrane components of *B. melitensis*. *B. melitensis* develops resistance to streptomycin by down-regulating the expression of *virB3* and *virB5* of the type IV secretion system. This study provides new insights into the research on the antibiotic-resistant strains of *Brucella* spp. and offers candidate targets for the development of new agents for treating brucellosis.

Keywords: *Brucella melitensis*; streptomycin; type IV secretion system; VirB operon

布鲁氏菌病(以下简称布病)是由革兰氏阴性菌—布鲁氏菌(*Brucella* spp.)引起的世界范围内的人兽共患病, 通常通过直接接触患病动物或者摄入灭菌不彻底的患病动物制品感染^[1]。人患布病后, 表现出发热、乏力、关节疼痛等症状, 诊疗不当还容易引发各种并发症^[2], 由

该病导致的患者劳动力丧失和动物繁殖障碍每年造成数十亿美元的损失。近年来, 世界范围内人和动物的布病均呈再流行趋势, 每年布病新增感染病例超过 50 万例^[3], 并且真正的感染人数是实际报道的 10–25 倍^[4]。随着经济的发展、频繁的牲畜及畜产品贸易和全球旅游增

强了布鲁氏菌的传播^[5]。从家养牲畜到野生动物,甚至海洋动物,布鲁氏菌均能感染。人和动物面临布鲁氏菌带来的健康和公共卫生威胁越来越大。

我国布病流行比较严重,布病是我国法定报告传染病系统中新增病例增长最快的人兽共患病(<https://www.ndcpa.gov.cn/jbkzxx/c100016/common/list.html>)。近年来越来越多的报道表明布鲁氏菌存在耐药株^[6]。耐药株的存在加剧了布病防控的难度。链霉素是世界卫生组织(World Health Organization, WHO)推荐的布病治疗一线用药^[7],自1986年起一直应用至今。链霉素属于氨基糖苷类抗生素,作用于细菌的核糖体30S亚基,抑制细菌蛋白质的合成,进而发挥杀菌活性^[8]。团队前期的研究发现,我国新疆存在链霉素最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)较高的羊种分离株(4 µg/mL,标准菌株为0.5–1.0 µg/mL),并且未发现已报道的链霉素耐药基因获得突变^[9]。因此,为筛选并鉴定布鲁氏菌链霉素耐受新基因,本研究拟利用转录组分析链霉素耐受相关基因,并利用同源重组等技术鉴定相关基因的功能,以期为布鲁氏菌耐药株的研究提供新思路,为布鲁氏菌新药研发提供候选靶点。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

羊种布鲁氏菌(*B. melitensis*)疫苗株M5、药敏质控菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922和pgex-18AP质粒、pBBR1MCS质粒由中国农业科学院畜牧兽医研究所动物生物安全与公共卫生防控团队保藏、复苏及培养;相关试验在中国农业科学院畜牧兽医研究所动物生物安全与公共卫生防控团队生物安全二级实验室(BSL-2)内完成。

羊种布鲁氏菌疫苗株M5的基因组、基因及编码蛋白序列下载自NCBI RefSeq数据库(https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/348/645/GCF_000348645.1_MD5v1/)。

1.2 主要试剂和仪器

链霉素(streptomycin, SM)标准品,中国食品药品检定研究院;RNAprotect Bacteria Reagent,凯杰生物(北京)有限公司;细菌总RNA提取试剂盒,天根生化生物(北京)有限公司;二代测序MGISEQ-2000RS测序芯片、MGISEQ-2000RS高通量测序试剂盒,深圳华大智造科技股份有限公司;Premix *ExTaq* (Probe qPCR)、PrimeScript RT Reagent Kit, 2×Premix *Taq*, 宝日医生物技术(北京)有限公司;ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

二代测序仪器MGISEQ-2000,深圳华大智造科技股份有限公司;Qubit 4 Fluorometer, Invitrogen公司;NanoDrop, Thermo Scientific公司;PCR扩增仪, Bio-Rad公司;电子比浊仪, BioMerieux公司;荧光定量PCR仪,西安天隆科技有限公司。

1.3 培养基

布氏肉汤及布氏琼脂培养基参考文献[10]配制;蔗糖培养基,在布氏琼脂培养基添加0.22 µm滤膜过滤除菌后的蔗糖溶液,使培养基中蔗糖终浓度为10%。

1.4 体外链霉素MIC值的检测

参考文献[10]建立的方法,利用96孔平板倍比稀释链霉素至0.125–256 µg/mL,加入100 µL稀释的M5菌液(约为 1×10^5 CFU/孔), (35 ± 2) °C生化培养箱中培养48 h后读取MIC值。大肠杆菌ATCC 25922作为质控菌株,以未加菌液的培养基作为阴性对照。

1.5 *rpsL* 基因的检测

参考文献[10]建立的方法提取基因组

DNA, 针对链霉素作用布鲁氏菌靶基因 *rpsL* 全长序列, 利用 Primer 5 设计上游引物(5'-ATGCC TACCGTAAACCAGC-3')和下游引物(5'-ACTT CGGACGCTTTGCACC-3')进行 PCR 扩增。反应体系(20 μ L): 2 \times Premix *Taq* 10 μ L, 引物(1.0 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 1 μ L, 灭菌双蒸水 7 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.6 生长特性检测及转录组测序分析

划线布氏琼脂培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 M5 疫苗株, 取单菌落分别加入布氏肉汤及添加 1 μ g/mL 链霉素的布氏肉汤培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养, 每 12 h 检测 1 次 OD_{600} 的值。

另取单菌落按上述条件培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6 左右, 加入 RNAprotect Bacteria Reagent 处理后, 参考前期建立的方法^[10], 分别提取总 RNA。利用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 用 NanoDrop 检测 RNA 的浓度。利用磁珠去除 $OD_{260/280} \geq 1.8$ 、 $OD_{260/230} \geq 1.8$ 及 RIN 值 ≥ 7.0 样品中的 rRNA, 反转录为 cDNA 后, 利用 Qubit 4 Fluorometer 检测浓度, 适当稀释后取 100 ng 利用相应的试剂盒进行酶切打断、片段回收、末端修复、添加接头、PCR 扩增、变性、单链环化后, 制备、加载 droplet-based nucleic acid (DBN), 使用 MGISEQ-2000 测序仪测序, 测序覆盖度大于 200 \times 。

参考前期建立的方法^[10]处理测序原始数据获得 clean data。将 clean data 与 M5 参考菌株基因组进行比对, 利用 SAMtools^[11]去除不合格序列, 利用 RSEM^[12]软件将基因组注释文件定量分析, 获得每个样品的表达量数据, 利用 edgeR^[13]将表达量数据均一化并分析差异表达基因。 $|\log_2FC| \geq 2.0$ 且 $P < 0.05$ 条件下为差异表达基因筛选阈值。利用 clusterProfiler 将差异表

达基因进行 Gene Ontology (GO) 和 KEGG pathway 富集分析, 将 $P < 0.05$ 的通路定义为显著富集的通路。

1.7 荧光定量检测

利用荧光定量 PCR 法(qPCR)检测相关基因的表达。利用 PrimeScript RT Reagent Kit 将提取的总 RNA 反转录为 cDNA。qPCR 体系及反应条件参考 Premix *ExTaq* (Probe qPCR)说明书。反应结束后执行熔解曲线, 确定反应产物的单一性。通过相对定量方法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)比较添加链霉素后参考基因的表达水平, 布氏肉汤培养基中 M5 菌株的 16S rRNA 表达水平用作参考以标准化所有值。每个样品重复 3 次。

1.8 基因缺失株及回补株的构建

参考文献[10]构建基因缺失株。分析质粒 pgex-18AP 的酶切位点, 按照 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切位点, 对 pgex-18AP 质粒进行双酶切后回收。设计引物(表 1), PCR 扩增目的基因上、下游各约 500 bp 片段。PCR 反应体系(50 μ L): M5 菌液模板 1 μ L, 上、下游引物各 2 μ L, ddH₂O 20 μ L, 2 \times Premix *Taq* 25 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。利用 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 将上、下游片段的 PCR 产物等量混合并连接至 pgex-18AP 载体, 转化至 DH5 α 感受态细胞中。提取阳性质粒电转入 M5 疫苗株中, 利用蔗糖培养基复筛, 挑选阳性菌落。

利用 pBBR1MCS 质粒构建回补菌株, 按照参考文献[10]的操作完成回补菌株的构建及鉴定。

1.9 分子对接

在 AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.com>)下载目的蛋白预测的蛋白结构, 在 NCBI PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)下载链霉素(CID 19649)分子

表 1 *virB* 操纵子基因扩增引物Table 1 Primers for amplification of *virB* operon genes

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')
<i>virB1</i> -f	gccgctctagaactagtgatccATGGTGCCATTCCTTGTCCCTC
<i>virB1</i> -r	gggaacaaaagctgggtaccTTAGAAAACAACACTACGCCGTCGG
<i>virB2</i> -f	cgctctagaactagtgatccATGAAAACCGCTTCCCCCAGCAAG
<i>virB2</i> -r	ccctcactaaagggaacaaaagctgggtaccTTACCTAAGCAGTAAGAGG
<i>virB3</i> -f	ccgctctagaactagtgatccATGACAACGGCACCCACAGG
<i>virB3</i> -r	ctaaagggaacaaaagctgggtaccTTATGATTCTCTTTTGCCTTTGTGAAGGC
<i>virB4</i> -f	cgctctagaactagtgatccATGGGCGCTCAATCCAAATACGCG
<i>virB4</i> -r	ctcactaaagggaacaaaagctgggtaccTCACCTTCCTGTTGATTTGG
<i>virB5</i> -f	ctctagaactagtgatccATGAAGAAGATAATTCTCAGCTTCGCATTCGCCC
<i>virB5</i> -r	caaaaagctgggtaccTTAATAGGCGCTTCCAGTGCTTTTCG
<i>virB6</i> -f	gccgctctagaactagtgatccATGGTTAATCCTGTAATCTTTGAGTTC
<i>virB6</i> -r	ggaaacaaaagctgggtaccCTAATCCCTGTTGAACTGGCC
<i>virB7</i> -f	gctctagaactagtgatccATGAAAAAGGTAATCCTTGCTTTTGTGCGCC
<i>virB7</i> -r	gggaacaaaagctgggtaccTTAGTCCTCGTAAGTGTCAACG
<i>virB8</i> -f	gccgctctagaactagtgatccATGTTTGACGCAAACAATCTCC
<i>virB8</i> -r	ggaaacaaaagctgggtaccTCATTGCACCACTCCCATTCTGG
<i>virB9</i> -f	gccgctctagaactagtgatccATGAAAAGATTCTGCTTGCG
<i>virB9</i> -r	caaaaagctgggtaccTCATTGCAGGTTCTCCCCGGGCGATTTG
<i>virB10</i> -f	ccgctctagaactagtgatccATGACACAGGAAAACATTCCGG
<i>virB10</i> -r	ctaaagggaacaaaagctgggtaccTCACTTCGGTTTGACATCATAACAC
<i>virB11</i> -f	cgccgctctagaactagtgatccATGTCAAACCGAAGTGA
<i>virB11</i> -r	ggaaacaaaagctgggtaccTCATTGCGCCTTCTCACTGTGTTG

大写字母是亲本菌株的序列，小写字母是来自质粒的序列。

Uppercase letters represent sequences derived from the parental strain, and lowercase letters represent sequences derived from the plasmid.

结构，利用 MOE (2019) 默认参数快速优化蛋白结构后，使用全部位点进行分子对接，其余参数默认，筛选自由能最低且存在氨基酸与链霉素非共价键结合的模式。

1.10 数据统计

利用 Excel (2010) 对数据进行初步统计，利用 GraphPad Prism 5 和 R 绘制相关图片，利用 Jalview 进行序列比对，利用 SPSS Statistics 23 对数据进行差异统计， $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果与分析

2.1 羊种布鲁氏菌耐受低浓度链霉素

利用稀释法检测疫苗株 M5 链霉素 MIC

值，结果为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ ，而 Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (M45)^[9] 推荐的布鲁氏菌链霉素耐药折点 MIC 值为大于 $8 \mu\text{g/mL}$ 。因此，本研究选择超过 MIC 值且未达到耐药水平的链霉素浓度 $1 \mu\text{g/mL}$ ($2 \times \text{MIC}$) 进行后续菌株培养及转录组测序。

生长特性检测结果发现，菌株 M5 在 $1 \mu\text{g/mL}$ 的链霉素条件下生长较布氏肉汤培养下缓慢，差异显著 ($P < 0.001$) (图 1A)。检测添加链霉素的培养基中不同时间点菌株 M5 *rpsL* 基因序列，未发现 *rpsL* 基因突变 (图 1B)。以上结果表明，羊种布鲁氏菌能在靶基因不突变的条件下耐受低浓度链霉素。

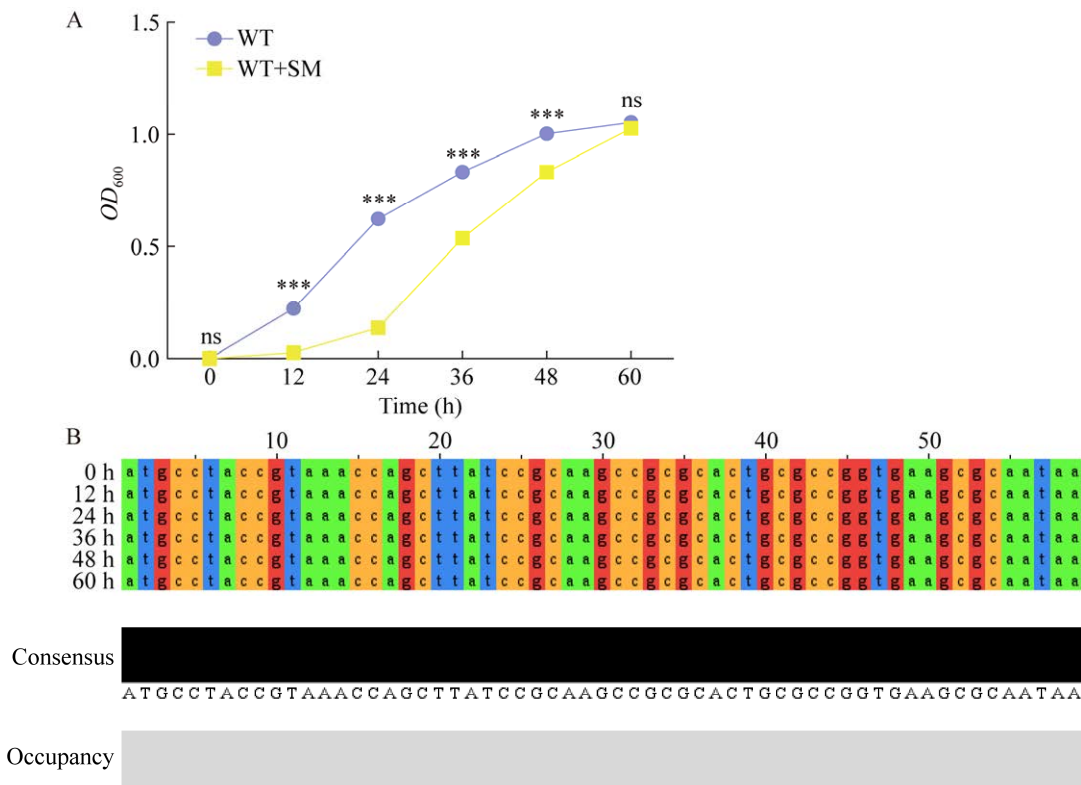


图1 添加链霉素后菌株 M5 的生长特性及 *rpsL* 基因变异检测 A: 生长特性检测(WT 为布氏肉汤培养的亲本株, WT+SM 为添加 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素布氏肉汤培养的亲本株。ns: $P>0.05$, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$)。B: *rpsL* 基因变异检测。

Figure 1 Growth characteristics and variations in the *rpsL* gene of the M5 strain under normal conditions and in medium supplemented with added streptomycin. A: Growth curves of the strains in different media. WT represents the wild-type strain cultured in Brucella broth, and WT+SM represents the WT strain cultured in Brucella broth supplemented with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. ns: $P>0.05$, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$. B: Consensus sequence analysis of the *rpsL* gene by sequencing.

2.2 羊种布鲁氏菌细胞膜组成成分在低浓度链霉素耐受中的重要作用

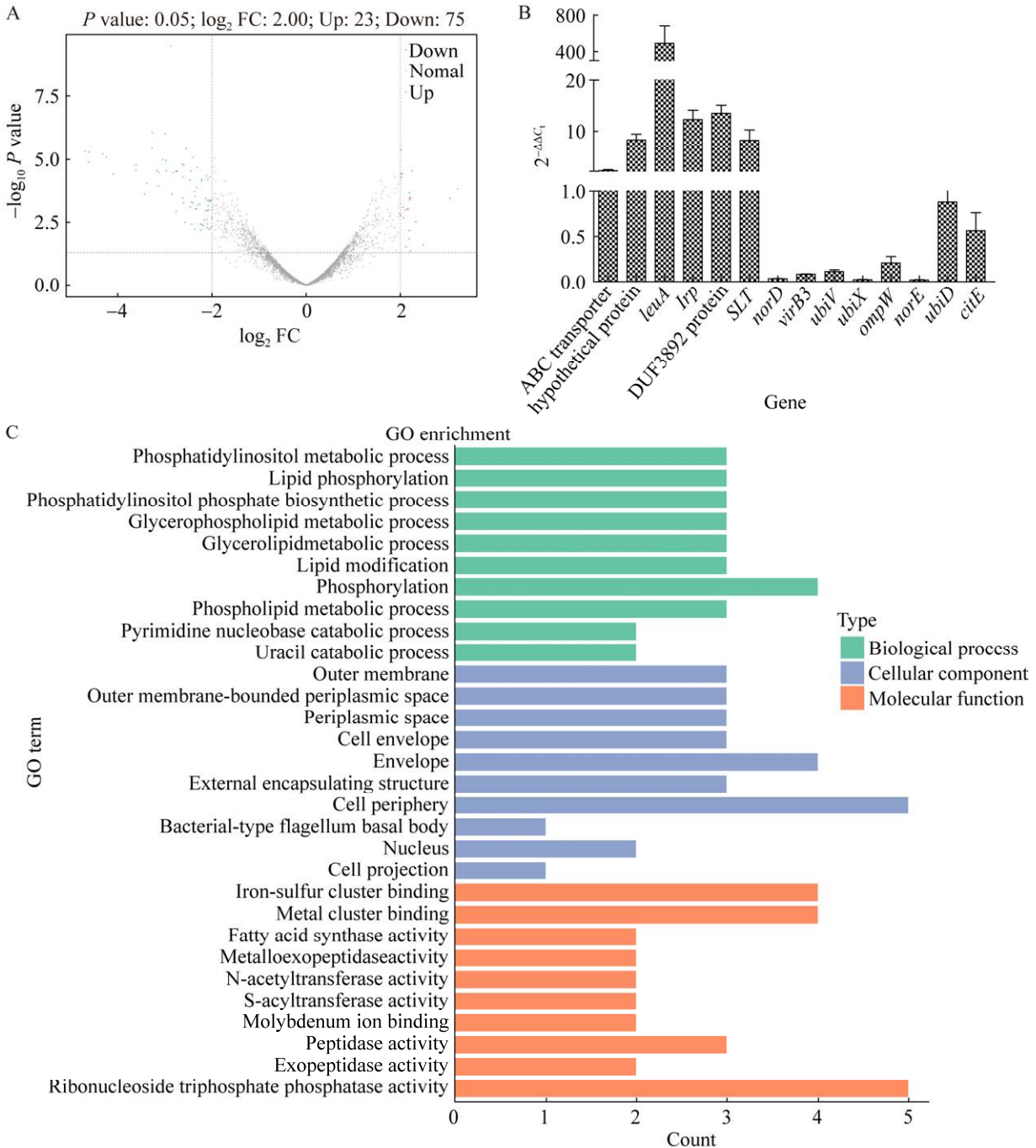
转录组测序表明, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素培养下, 菌株 M5 存在 98 个基因显著性差异表达, 其中 23 个基因表达量显著性上调, 75 个基因表达量显著性下调(图 2A), qPCR 检测部分基因的相对表达量, 表明转录组分析结果可靠(图 2B)。GO 功能分类结果表明, 显著性上调基因主要功能为分子功能(molecular function, MF) (图 2C), 显著性下调基因主要功能为生物过程(biological process, BP) (图 2D)。对显著性差异表达的基因进行 KEGG

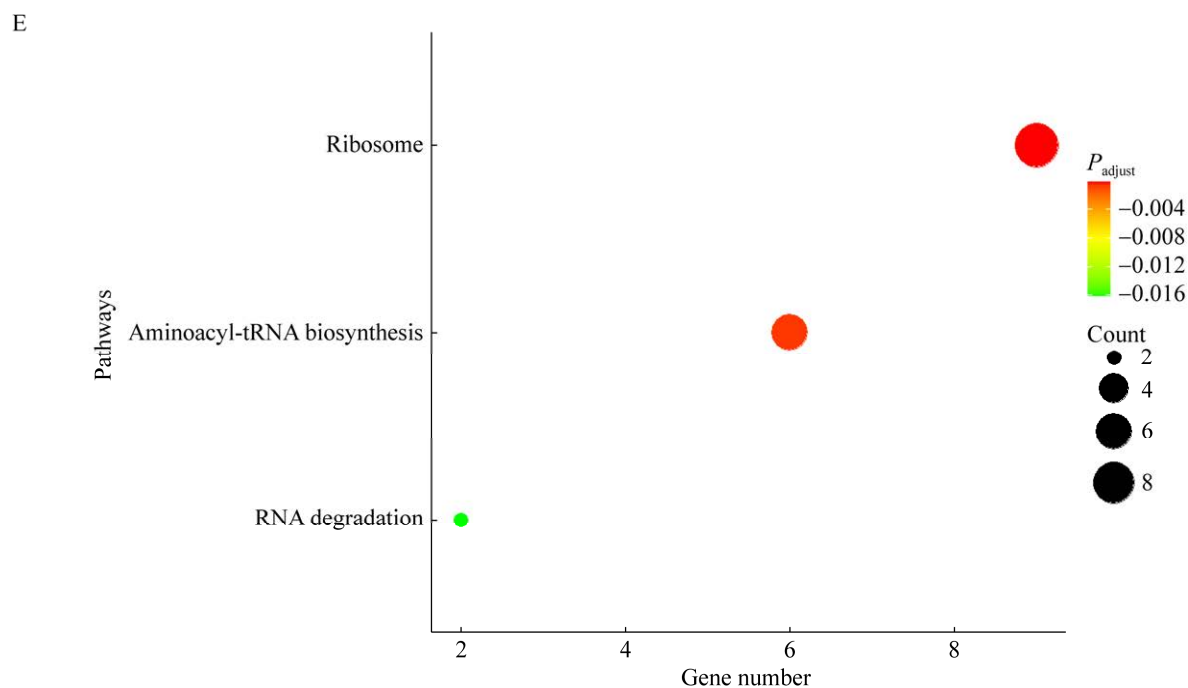
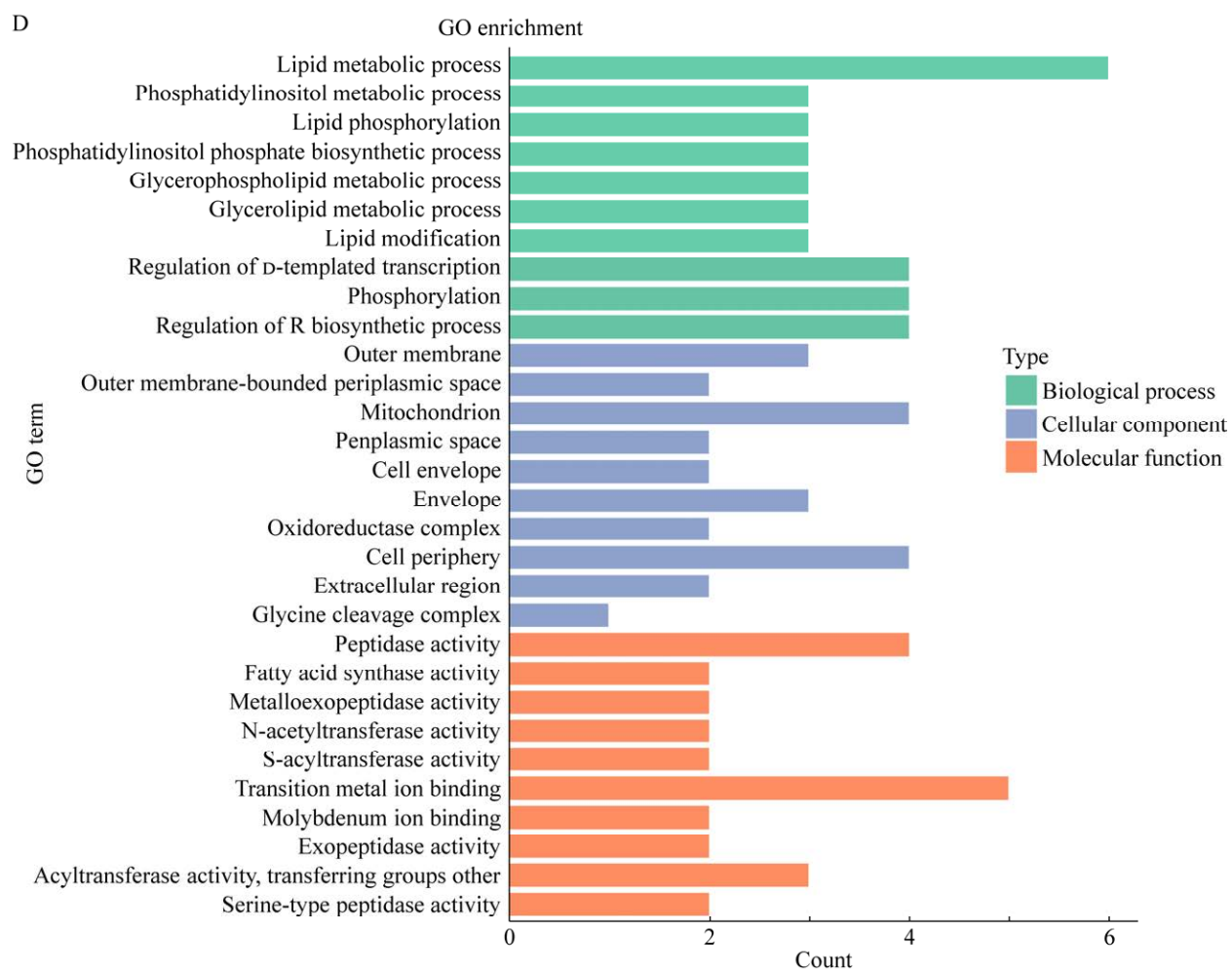
pathway 分析, 结果表明, 上调基因主要参与核糖体(ribosome)和氨酰基-tRNA 生物合成(aminoacyl-tRNA biosynthesis)途径(图 2E), 下调基因主要参与群体感应(quorum sensing)和细菌分泌系统(bacterial secretion system)途径(图 2F)。转录组测序分析发现, 添加 2 \times MIC 链霉素后, IV型分泌系统组成基因表达量均下调, 其中 *virB1*、*virB3*、*virB4* 和 *virB5* 基因的表达量显著降低。以上结果表明, 链霉素主要作用羊种布鲁氏菌细胞膜组成成分涉及的相关通路, 其中IV型分泌系统在链霉素耐受过程中发挥重要作用。

2.3 羊种布鲁氏菌IV型分泌系统耐受链霉素的作用

为研究IV型分泌系统中各基因在链霉素耐受中的作用,本研究利用同源重组技术分别缺失组成IV型分泌系统的 *virB1-11* 基因,并检测缺失株的 MIC 值。结果发现,缺失 *virB1-11*

基因后不影响布鲁氏菌增殖(图 3A),缺失 *virB3* 和 *virB5* 基因后菌株链霉素 MIC 值增高,回补基因后 MIC 值与亲本株差异不显著(图 3B)。以上结果表明,羊种布鲁氏菌通过降低IV型分泌系统中的 *virB3* 和 *virB5* 基因的表达耐受链霉素。





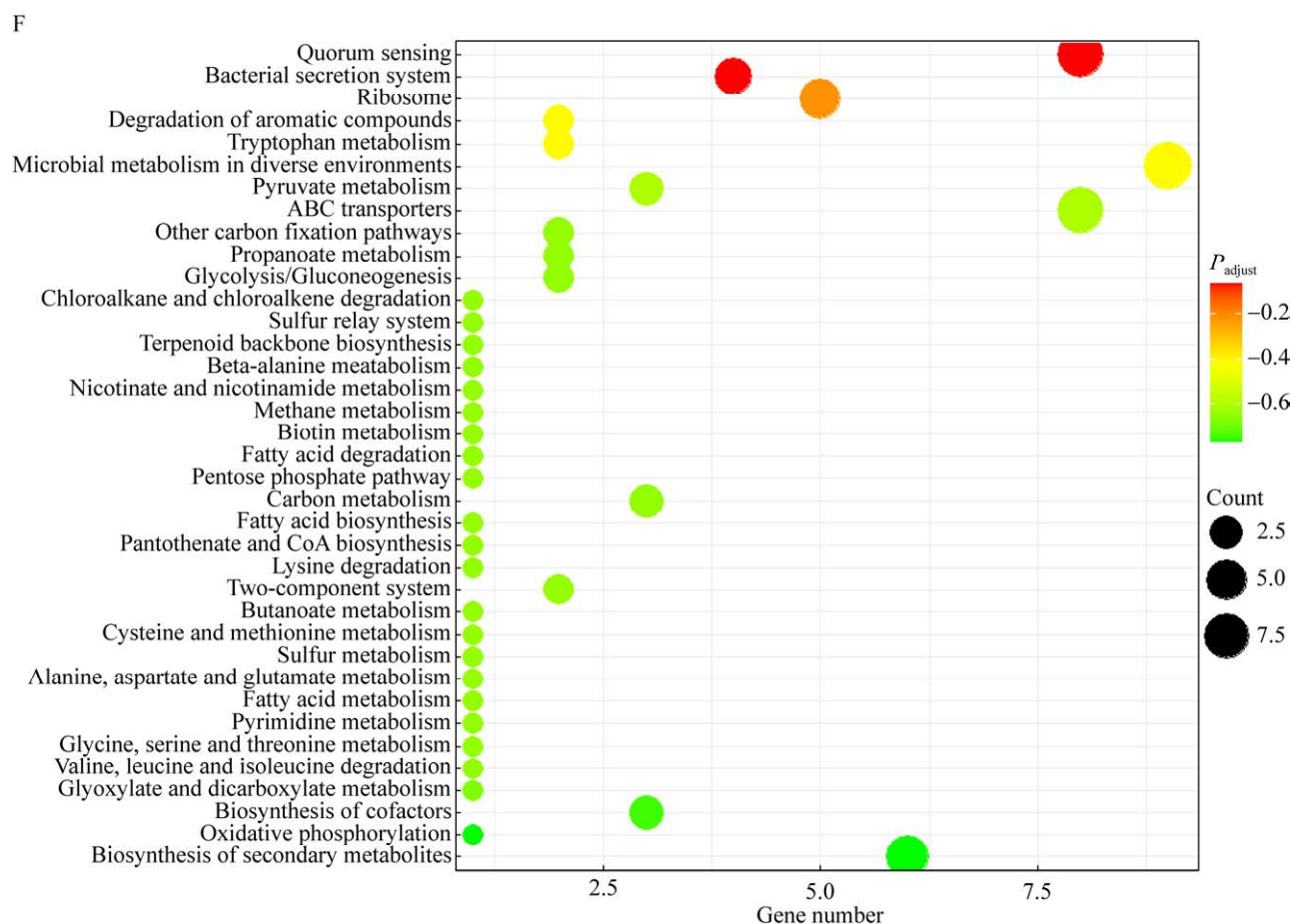


图2 链霉素条件下转录组分析 A: 差异表达基因火山图; B: qPCR 定量检测基因的表达量; C: 显著性上调基因 GO 功能分类; D: 显著性下调基因 GO 功能分类; E: 显著性上调基因 KEGG pathway 功能分类; F: 显著性下调基因 KEGG pathway 功能分类。

Figure 2 Transcriptome analysis under streptomycin conditions. A: Volcano plot of differentially expressed genes; B: Quantitative gene expression analysis by qPCR; C: GO functional classification of significantly upregulated genes; D: GO functional classification of significantly downregulated genes; E: KEGG pathway functional classification of significantly upregulated genes; F: KEGG pathway functional classification of significantly downregulated genes.

分子对接试验表明, VirB3 和 VirB5 蛋白能够与链霉素结合。链霉素可与 VirB3 蛋白中 20 位 Ile、104 位 Tyr 和 22 位 Lys 以氢键结合(图 3C 和 3D); 可与 VirB5 蛋白中 201 位 Gln、142 位 Asp 以氢键结合(图 3E 和 3F)。以上结果表明, 链霉素可能通过结合 IV 型分泌系统中 VirB3 和 VirB5 蛋白进入布鲁氏菌内, 进而发挥杀菌作用。

3 讨论

世界范围内已有对链霉素耐药的布鲁氏菌分离株的报道。有研究系统性分析 1983–2020 年布鲁氏菌对氨基糖苷类抗生素的耐药性, 发现布鲁氏菌对链霉素、庆大霉素和阿米卡星的耐药率分别为 2.7% (95% CI, 0.015–0.049)、2.3% (95% CI, 0.017–0.032) 和 0.8% (95% CI, 0.002–0.039),

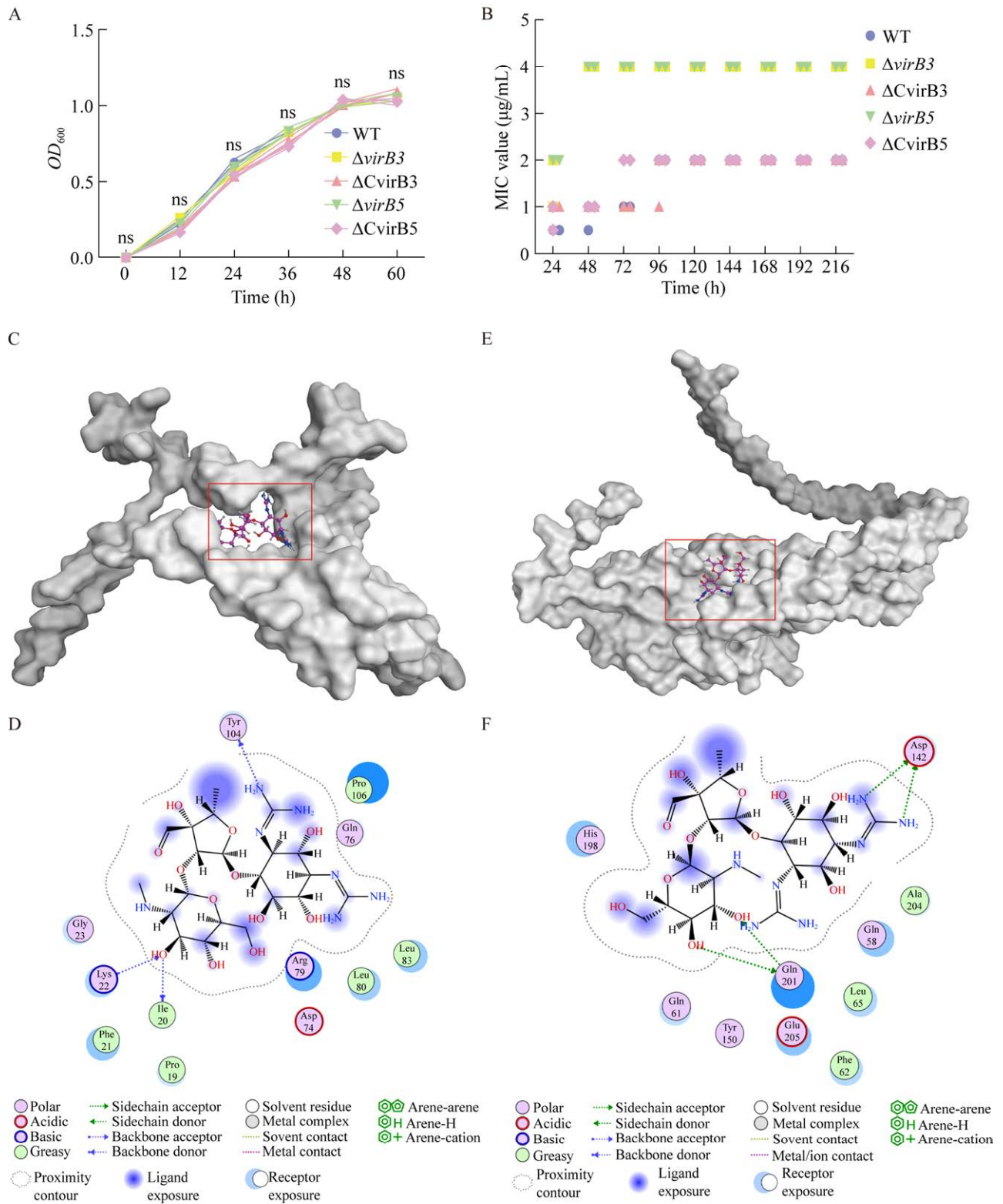


图 3 VirB3 和 VirB5 蛋白在羊种布鲁氏菌链霉素耐受中发挥重要作用 A: 亲本与缺失株生长特性检测。B: 体外检测亲本与缺失株链霉素最小抑菌浓度。WT 为亲本株, $\Delta virB3$ 为 *virB3* 基因缺失株,

$\Delta virB5$ 为 *virB5* 基因缺失株, *CvirB3* 为 *virB3* 基因缺失株的回补株, *CvirB5* 为 *virB5* 基因缺失株的回补株。C: 分子对接预测 VirB3 蛋白与链霉素结合模型, 红色框内为预测链霉素与 VirB3 蛋白结合区域。D: VirB3 蛋白中氨基酸与链霉素结合位点的 2D 模型。E: 分子对接预测 VirB5 蛋白与链霉素结合模型, 红色框内为预测链霉素与 VirB5 蛋白结合区域。F: VirB5 蛋白中氨基酸与链霉素结合位点的 2D 模型。

Figure 3 VirB3 and VirB5 proteins play important roles in streptomycin tolerance of *B. melitensis*. A: Growth characteristics of wild-type and deletion strains. B: MIC value of streptomycin for WT and deletion strains *in vitro*. WT indicates wild-type strain, $\Delta virB3$ represents the *virB3* gene deletion strain, $\Delta virB5$ represents the *virB5* gene deletion strain, *CvirB3* represents the *virB3* gene complement strain, and *CvirB5* represents the *virB5* gene complement strain. C: Molecular docking prediction model of the VirB3 protein with the streptomycin binding site. The red box indicates the predicted binding region between streptomycin and VirB3 protein. D: 2D model of the amino acid residues at the streptomycin binding site in the VirB3 protein. E: Molecular docking prediction model of the VirB5 protein with the streptomycin binding site. The red box indicates the predicted binding region between streptomycin and the VirB5 protein. F: 2D model of the amino acid residues at the streptomycin binding site in the VirB5 protein.

并且近年来布鲁氏菌对氨基糖苷类抗生素的耐药性有所增加^[14]。早在 1947 年就报道了牛种布鲁氏菌分离株能够对链霉素产生耐药^[15]。研究表明, 链霉素作用布鲁氏菌的靶基因为 *rpsL* 和 *rrs*^[8], 靶基因突变后能够导致布鲁氏菌耐链霉素。目前, 布鲁氏菌中明确链霉素耐药的是布鲁氏菌疫苗株 Rev.1, 该疫苗株在含链霉素的培养基中传代获得, 测序发现该菌株 *rpsL* 基因存在突变^[16]。现阶段布鲁氏菌耐药相关的研究大多局限于分离株药物敏感性和已报道的耐药基因检测, 其他的链霉素耐药机制, 如获得耐药基因 *aadA* (修饰链霉素), 在布鲁氏菌中鲜有报道。近年来国内外研究人员均发现了部分耐药株无已报道的耐药基因获得/突变^[17-18]现象。本研究利用转录组筛选链霉素耐受相关基因, 发现 98 个基因的表达量受链霉素影响, 其中核糖体途径、群体感应和 IV 型分泌系统相关基因的表达量显著性改变, 其中 *rpsL* 基因的表达量显著性上调 ($|\log_2FC| \geq 2.0$, $P < 0.05$), *rrn* 基因的表达量上调但差异不显著 ($|\log_2FC| < 2.0$, $P < 0.05$)。本研究发现的显著性差异相关通路可为后续研究布鲁氏菌链霉素耐受提供候选基因及研究

思路。

IV 型分泌系统在布鲁氏菌药物耐受中发挥重要作用。IV 型分泌系统存在于多种革兰氏阴性菌中, 是一种多蛋白复合物^[19], 由 *virB* 操纵子编码, 包括 *virB1-11* 以及 *virD* 基因^[20]。*virB* 操纵子中不同的基因功能不同。VirB1 蛋白可能影响着其他 VirB 蛋白, VirB6、VirB7 和 VirB10 蛋白是细菌跨膜蛋白的传送信号, VirB4 和 VirB11 蛋白与 VirD 蛋白偶联, 使 ATP 酶从表面跨膜进入细胞质, VirB2 和 VirB5 蛋白可能是细菌表面菌毛结构蛋白^[21], VirB5 蛋白是靶向宿主细胞受体的特异性黏附素^[22], 在布鲁氏菌入侵宿主细胞的过程中发挥重要作用, 同时也与胞内运输相关^[23], VirB3 蛋白位于 IV 型分泌系统内膜, 帮助形成分泌通道, 并通过与其他 VirB 蛋白的正确组装, 支持布鲁氏菌在宿主细胞中的生存、增殖及逃避免疫^[24], VirB8 在 IV 型分泌系统中起主要作用, 主要是与 VirB9 和 VirB10 在细胞膜上形成群体^[21], VirB12 功能尚不明确, 推测可能与复合体的装配有关^[25]。研究发现, 除 VirB7 外, VirB3–VirB11 蛋白都是布鲁氏菌在鼠体内维持毒力的必要组成部分^[26],

virB3 和 *virB5* 基因在布鲁氏菌标准株和分离株中高度保守^[26-27]。IV型分泌系统不仅是布鲁氏菌的重要毒力因子，还与药物耐受相关。有研究表明，*virB7-11* 基因在羊种布鲁氏菌利福平耐受中发挥重要作用，缺失 *virB7-11* 基因后布鲁氏菌的利福平 MIC 值增加^[10]。本研究利用同源重组技术构建IV型分泌系统缺失株，发现缺失 *virB3* 和 *virB5* 基因可导致疫苗株 M5 链霉素 MIC 值增加，表明布鲁氏菌通过降低 *virB3* 和 *virB5* 基因的表达来耐受链霉素。IV型分泌系统在布鲁氏菌其他药物耐受中是否发挥重要作用，还需进一步研究。

4 结论

综上所述，本研究利用转录组筛选羊种布鲁氏菌链霉素耐受新基因，并利用同源重组技术鉴定相关基因的功能。研究发现，添加链霉素后，羊种布鲁氏菌菌株 M5 核糖体通路相关基因表达量增加，群体感应和IV型分泌系统通路相关基因表达量降低。同时，IV型分泌系统在布鲁氏菌链霉素耐受中发挥重要作用，布鲁氏菌通过降低 *virB3* 和 *virB5* 基因的表达耐受链霉素。本研究为我国布鲁氏菌耐药株研究提供新思路，为我国布病防控提供基础数据。同时，研究筛选的基因可作为布鲁氏菌新药研发的新靶点。

REFERENCES

- [1] NELSON-JONES A. Brucellosis[J]. Postgraduate Medical Journal, 1952, 28(324): 529-534.
- [2] PAPPAS G, AKRITIDIS N, BOSILKOVSKI M, TSIANOS E. Brucellosis[J]. The New England Journal of Medicine, 2005, 352(22): 2325-2336.
- [3] BUKHARI EE. Pediatric brucellosis. An update review for the new millennium[J]. Saudi Medical Journal, 2018, 39(4): 336-341.
- [4] ROUSHAN MRH, EBRAHIMPOUR S. Human brucellosis: an overview[J]. Caspian Journal of Internal Medicine, 2015, 6(1): 46-47.
- [5] PAPPAS G, PAPADIMITRIOU P, AKRITIDIS N, CHRISTOU L, TSIANOS EV. The new global map of human brucellosis[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2006, 6(2): 91-99.
- [6] REZAEI SHAHRABI A, MORADKASANI S, GOODARZI F, BEIG M, SHOLEH M. Prevalence of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* tetracyclines resistance: a systematic review and meta-analysis[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 183: 106321.
- [7] Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis[J]. World Health Organization Technical Report Series, 1986, 740: 1-132.
- [8] LANG M, CARVALHO A, BAHAROGLU Z, MAZEL D. Aminoglycoside uptake, stress, and potentiation in Gram-negative bacteria: new therapies with old molecules[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2023, 87(4): e0003622.
- [9] YANG XW, LIU Y, LI N, PENG XW, ZHANG YH, ZHANG XQ, LIANG L, BIAN ZJ, JIANG H, DING JB. Analysis of the *Brucella melitensis* epidemic in Xinjiang: genotyping, polymorphism, antibiotic resistance and tracing[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2024, 23(1): 71.
- [10] YANG XW, WU TL, LIU WX, TIAN GZ, ZHAO HY, PIAO DR, JIANG H, WU QM. Cell membrane components of *Brucella melitensis* play important roles in the resistance of low-level rifampicin[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2020, 14(12): e0008888.
- [11] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, FENNELL T, RUAN J, HOMER N, MARTH G, ABECASIS G, DURBIN R, GENOME PROJECT DATA PROCESSING SUBGROUP 1000. The sequence alignment/map format and SAMtools[J]. Bioinformatics, 2009, 25(16): 2078-2079.
- [12] LI B, DEWEY CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 323.
- [13] ROBINSON MD, MCCARTHY DJ, SMYTH GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139-140.
- [14] MORADKASANI S, GOODARZI F, BEIG M, TADI DA, SHOLEH M. Prevalence of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* aminoglycoside-resistant isolates: a systematic review and meta-analysis[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2024, 55(1): 429-439.
- [15] HALL WH, SPINK WW. *In vitro* sensitivity of *Brucella* to streptomycin; development of resistance during streptomycin treatment[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine, 1947, 64(4): 403-406.
- [16] BLASCO JM, DÍAZ R. *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis[J]. Lancet, 1993, 342(8874): 805.
- [17] DADAR M, ALAMIAN S, BRANGSCH H, ELBADAWY M, ELKHARSAWI AR, NEUBAUER H,

- WARETH G. Determination of virulence-associated genes and antimicrobial resistance profiles in *Brucella* isolates recovered from humans and animals in Iran using NGS technology[J]. *Pathogens*, 2023, 12(1): 82.
- [18] MA HR, XU HJ, WANG X, BU ZY, YAO T, ZHENG ZR, SUN Y, JI X, LIU J. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of human *Brucella* in Northeast China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1137932.
- [19] BURNS DL. Type IV transporters of pathogenic bacteria[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(1): 29-34.
- [20] SANTOS LACERDA TL, SALCEDO SP, GORVEL JP. *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(1): 45-51.
- [21] CARLE A, HÖPPNER C, AHMED ALY K, YUAN Q, den DULK-RAS A, VERGUNST A, O'CALLAGHAN D, BARON C. The *Brucella suis* type IV secretion system assembles in the cell envelope of the heterologous host *Agrobacterium tumefaciens* and increases IncQ plasmid pLS1 recipient competence[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(1): 108-117.
- [22] DENG HK, ZHOU J, GONG BB, XIAO MC, ZHANG MM, PANG QX, ZHANG XF, ZHAO BS, ZHOU XC. Screening and identification of a human domain antibody against *Brucella abortus* VirB5[J]. *Acta Tropica*, 2019, 197: 105026.
- [23] BACKERT S, FRONZES R, WAKSMAN G. VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems?[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(9): 409-413.
- [24] XIONG X, LI BW, ZHOU ZX, GU GJ, LI MJ, LIU J, JIAO HW. The VirB system plays a crucial role in *Brucella* intracellular infection[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(24): 13637.
- [25] SHIRASU K, KADO CI. Membrane location of the Ti plasmid VirB proteins involved in the biosynthesis of a pilin-like conjugative structure on *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 111(2/3): 287-293.
- [26] den HARTIGH AB, ROLÁN HG, de JONG MF, TSOLIS RM. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(13): 4427-4436.
- [27] ANBAZHAGAN S, HIMANI KM, KARTHIKEYAN R, PRAKASAN L, DINESH M, NAIR SS, LALSAMTHARA J, Abhishek, RAMACHANDRA SG, CHATURVEDI VK, CHAUDHURI P, THOMAS P. Comparative genomics of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unravels the gene sharing, virulence factors and SNP diversity among the standard, vaccine and field strains[J]. *International Microbiology*, 2024, 27(1): 101-111.