

研究报告

羊源肺炎克雷伯氏菌 KPHN001 的全基因组测序和比较基因组分析

兰凤, 杨映雪, 徐乐, 李世元, 李素雅, 焦玉清, 陈思, 陈巧玲, 满初日嘎, 杜丽, 王凤阳, 高宏岩*

海南大学 热带农林学院 海南省热带动物繁育与疫病研究重点实验室, 海南 海口 570228

兰凤, 杨映雪, 徐乐, 李世元, 李素雅, 焦玉清, 陈思, 陈巧玲, 满初日嘎, 杜丽, 王凤阳, 高宏岩. 羊源肺炎克雷伯氏菌 KPHN001 的全基因组测序和比较基因组分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2315-2330.

LAN Feng, YANG Yingxue, XU Le, LI Shiyuan, LI Suyu, JIAO Yuqing, CHEN Si, CHEN Qiaoling, Manchuriga, DU Li, WANG Fengyang, GAO Hongyan. Whole genome sequencing and comparative genomic analysis of goat-derived *Klebsiella pneumoniae* KPHN001[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2315-2330.

摘要: 【背景】肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)是一种革兰氏阴性杆菌, 能够引发人类和动物呼吸道感染、尿路感染和败血症等。本实验室前期在海南黑山羊的患病羔羊中分离鉴定出一株肺炎克雷伯氏菌, 命名为菌株 KPHN001。【目的】扩充肺炎克雷伯氏菌的基因组数据库信息, 明确菌株 KPHN001 的遗传进化关系。【方法】采用第 3 代 Oxford Nanopore Technologies (ONT) 和第 2 代 Illumina 两种测序技术相结合的方式, 通过全基因组测序和比较基因组学来对菌株进行基因功能注释和生物信息学分析, 并利用 PCR 技术验证测序结果。【结果】菌株 KPHN001 全基因组大小为 5 470 968 bp, G+C 含量为 56.66%, 预测到的编码基因有 5 135 个, 包含 25 个 rRNA、86 个 tRNA 基因和 58 个 sRNA; 含 14 个基因岛、3 个前噬菌体; 在 KEGG 和 COG 数据库中分别注释 3 321 和 4 075 个基因, 根据分析结果绘制该菌株的全基因组圈图。比较基因组分析发现该菌株与菌株 HS11286 进化关系最接近。本研究还对选取的相关耐药基因进行了 PCR 检测, 成功筛选出 4 个耐药基因, 分别为 *SHV-11*、*H-NS*、*FosA* 和 *MdtQ*。这些基因的存在表明该菌株具有多重耐药性。【结论】通过全基因组和比较基因组学分析, 揭示了菌株 KPHN001 的遗传信息。同时, 通过比较不同菌株之间的差异, 为肺炎克雷伯氏菌的鉴定和临床防治奠定了遗传学基础。

关键词: 海南黑山羊; 肺炎克雷伯氏菌; 全基因组测序; 基因组图谱; 比较基因组学

资助项目: 海南省自然科学基金(324QN201); 国家肉羊产业技术体系(CARS-38); 海南省金宁一院士创新中心; 海南大学科研启动基金[KYQD(ZR)22167]

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hainan Province (324QN201), the National Sheep Industry Technology System (CARS-38), the Hainan Innovation Center for Academician of JIN Ningyi, and the Priming Scientific Research Foundation of Hainan University [KYQD(ZR)22167].

*Corresponding author. E-mail: gaohongyan@hainanu.edu.cn

Received: 2024-08-31; Accepted: 2024-12-04; Published online: 2025-01-23

Whole genome sequencing and comparative genomic analysis of goat-derived *Klebsiella pneumoniae* KPHN001

LAN Feng, YANG Yingxue, XU Le, LI Shiyuan, LI Suyu, JIAO Yuqing, CHEN Si, CHEN Qiaoling, Manchuriga, DU Li, WANG Fengyang, GAO Hongyan*

Hainan Key Laboratory for Tropical Animal Breeding and Disease Research, School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

Abstract: [Background] *Klebsiella pneumoniae* is a Gram-negative bacterium that can cause respiratory infections, urinary tract infections and sepsis in humans and animals. A strain of *K. pneumoniae*, named KPHN001, was isolated and identified from a diseased lamb of Hainan black goat. [Objective] To enrich the genomic information of *K. pneumoniae* and clarify the genetic evolutionary relationship of strain KPHN001. [Methods] This study used a combination of third-generation Oxford Nanopore Technologies (ONT) and second-generation Illumina for sequencing. The gene functions of the strain were annotated and bioinformatics analysis was conducted through whole-genome sequencing and comparative genomic analysis. The sequencing results were verified by PCR. [Results] The genome size of strain KPHN001 was 5 470 968 bp, with the G+C content of 56.66%. The genome carried 5 135 coding genes, 25 rRNAs, 86 tRNAs, and 58 sRNAs. There were 14 gene islands and 3 prophages. A total of 3 321 and 4 075 genes were annotated in KEGG and COG databases, respectively, and the circular whole genome diagram of the strain was drawn according to the analysis results. Comparative genomic analysis showed that strain KPHN001 shared the closest evolutionary relationship with HS11286. PCR was conducted for the selected antibiotic resistance genes, and four resistance genes (*SHV-11*, *H-NS*, *FosA*, and *MdtQ*) were mined out. The presence of these genes indicated that the strain was multidrug-resistant. [Conclusion] This study revealed genetic information of strain KPHN001 through whole genome sequencing and comparative genomic analysis. At the same time, by comparing the differences between different strains, this study laid a genetic basis for the identification and clinical application of *K. pneumoniae*.

Keywords: Hainan black goats; *Klebsiella pneumoniae*; whole genome sequencing; genome diagram; comparative genomics

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是一类革兰氏阴性菌,普遍存在于动物和人的黏膜表面(如肠道黏膜、呼吸道黏膜、尿道黏膜、生殖道黏膜)或环境(如水、土壤等)中。肺炎克雷伯氏菌是一种重要的条件致病菌,具有较强的致病性,常引发医源性感染,导致肺炎、败血症等多种感染性疾病^[1]。在抗生素出现之前,肺炎克雷伯氏菌是社区获得性肺炎

(community-acquired pneumonia, CAP)的重要病原体,尤其是在糖尿病患者和酗酒者中^[2]。后来由于抗生素的滥用,肺炎克雷伯氏菌逐渐发展出对多种抗生素的耐药性。

在动物体质衰弱、免疫力不健全等情况下,肺炎克雷伯氏菌可能引发多种疾病。近年来,国内外报道了多起家禽、家畜和野生动物感染肺炎克雷伯氏菌的病例^[3-12],其发病率和死亡率

均较高,对动物的危害不容忽视。在牛群中,肺炎克雷伯氏菌能够引起奶牛乳房炎、牛脑膜脑炎、犊牛呼吸道感染等疾病^[13-15]。在羊群中,肺炎克雷伯氏菌可引起羊患肺炎及上呼吸道感染,表现为咳嗽、呼吸急促、发热和食欲下降等症状;在泌乳期的母羊中,可能导致乳腺感染,进而影响乳羊的产奶量和质量;也可以引起羊的尿路感染,导致排尿困难、尿频和血尿等症状;如果感染进入血液中,可能导致败血症,表现为全身症状,如高热、脱水、低血压等,这是一种非常严重的情况,很大几率会导致死亡^[16]。肺炎克雷伯氏菌的流行引起了人们广泛关注,该菌严重威胁畜牧业的发展,造成巨大的经济损失^[17]。

肺炎克雷伯氏菌的相关研究在不断发展,包括新型抗菌药物的开发、感染控制措施的不断改进、疫苗研发以及高效的检测技术,但目前仍然面临诸多挑战,如:该菌抗药性机制复杂且多样,现有的研究方法和数据难以覆盖不同地区的菌株特征、基础研究与临床应用的转化不畅以及感染监测和数据收集的不全面等,都限制了对该菌株的全面理解和应对。随着高通量测序技术和分析方法的持续发展,越来越多的菌株已经完成基因测序。同时,比较基因组学能够更深入地揭示不同菌株基因组之间的差异,为多数临床菌株的分析比较提供了可行的方法。

本实验室前期从海南黑山羊患病羔羊中分离得到一株肺炎克雷伯氏菌(KPHN001)^[18]。为更好地了解菌株 KPHN001 的遗传变异和序列特征,本研究对该菌株进行全基因组测序并与其他肺炎克雷伯氏菌进行比较基因组学分析,探讨不同菌株之间的遗传特性,以期肺炎克雷伯氏菌的开发和应用奠定遗传学基础。

1 材料与方法

1.1 样品

肺炎克雷伯氏菌 KPHN001 分离自海南黑

山羊的患病羔羊,由本实验室保存^[18]。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

蛋白胨大豆琼脂(tryptone soya agar, TSA)培养基、蛋白胨大豆肉汤(tryptone soya broth, TSB)培养基、哥伦比亚血琼脂培养基和麦康凯琼脂培养基,青岛海博生物技术有限公司^[18]。phosphate buffered solution (PBS),武汉赛维尔生物科技有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DL2000 DNA marker,天根生化科技(北京)有限公司;琼脂糖, BioFroxx 公司; *Taq* PCR Master Mix, 生工生物工程(上海)股份有限公司;绿色荧光核酸染料,北京索莱宝科技有限公司。

PCR 仪, Bio-Rad 公司;离心机, Eppendorf 公司;微量电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;凝胶成像仪,北京赛智创业科技有限公司;琼脂糖凝胶电泳槽,北京六一生物科技有限公司。

1.3 菌株培养与基因组 DNA 的提取

在生物安全柜中取出菌液,经 500 μ L 无菌 PBS 稀释后,分别取 100 μ L 涂布于 TSA、哥伦比亚血琼脂培养基和麦康凯琼脂培养基上,平皿正置至表面干燥后,倒置放于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h,观察记录菌落形态。挑取单菌落接种于 5 mL TSB 中,37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 16–20 h,再将菌液划线接种于 TSA 中,37 $^{\circ}$ C 培养 20 h,使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株基因组 DNA。

1.4 KPHN001 的基因组测序和拼接

采用 Oxford Nanopore Technologies (ONT) 和 Illumina 测序平台对菌株 KPHN001 进行全基因组测序,由广州基迪奥生物科技有限公司完成。

1.5 基因组组分析

分别使用 Prokka^[19]、RepeatMasker^[20] 和 TRF^[21] 软件预测菌株 KPHN001 基因组中的编码序列、重复序列和串联重复序列;使用 RNAmmer^[22] 和 tRNAscan^[23] 软件分别预测 rRNA 和 tRNA;使用 cmscan^[24] 比对 Rfam 数据库,预

测 sRNA; 使用 CRISPRFinder^[25] 软件预测 CRISPR 数量; 使用在线工具 IslandViewer 4 预测基因岛; 使用 Phage_Finder^[26] 软件预测前噬菌体个数。

1.6 基因组功能注释

利用以下 4 个数据库进行基因组功能注释。

GO 数据库: 使用 Blast2GO 工具^[27] 得到基因的 GO 注释信息, 并对所有基因做 GO 功能分类统计, 从宏观上认识该物种的基因功能分布特征。

COG 数据库: 通过使用 DIAMOND^[28] 工具将基因组数据与 COG 数据库进行比对, 获取基因的注释信息, 并根据这些信息对蛋白质进行功能分类。

KEGG 数据库: 使用 DIAMOND^[28] 工具将基因组数据与 KEGG 数据库进行比对, 获得基因所对应的注释结果。

CAZy 数据库: 使用 BLASTp 工具^[29] 将基因序列与数据库比对注释。

1.7 共线性分析

使用 MUMmer^[30] 软件对目标基因组和参考基因组进行比对, 确定了基因组间的大范围共线性关系。之后使用 SyRI^[31] 对区域间进行比对, 确认局部位位置排列关系, 并从中查找易位、倒置和易位+倒置的区域。

1.8 基因家族分析

采用 DIAMOND^[28] 对所有参与分析的物种氨基酸 (或核苷酸) 序列进行比对, 使用 OrthoMCL^[32] 进行相似性聚类, 获得聚类为 cluster 的同源基因列表, 统计每一个蛋白聚类 cluster 的物种分布情况。

1.9 系统发育树分析和平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI) 分析

本研究利用最大似然法构建了菌株 KPHN001 基因组与参考基因组的系统发育树。使用测序物种与参考物种全基因组中均为单拷贝的基因家族中的基因, 利用 IQ-TREE^[33] 构建系统发育树, 研究物种间的进化关系。基于同

源基因家族聚类分析的结果, 选取单一拷贝的同源基因进行多序列比对和比对质量控制, 利用 MUSCLE^[34] 软件进行序列比对, 采用 Gblocks^[35] 软件进行比对质量控制, 然后基于单拷贝基因法构建系统发育树。

在共线性比对完成的基础上, 采用 PyANI^[36] 计算目标基因组与参考的近缘基因组的两两基因组比对区域的 ANI。ANI 是在核苷酸水平比较 2 个基因组亲缘关系的指标, ANI 值是 2 个微生物基因组同源片段之间平均的碱基相似度, 其特点是在近缘物种之间有较高的区分度, 通常, ANI 值以 95% 作为分类阈值区分不同物种。ANI 常用于细菌基因组的鉴定, 通过基因组序列比对判断是否为同一种或者亚种。

1.10 耐药基因的检测

使用 CARD 数据库对菌株 KPHN001 的基因组序列进行耐药基因检测, 共检测出 24 种耐药基因: *SHV-11*、*Klebsiella pneumoniae KpnF*、*Klebsiella pneumoniae KpnE*、*LptD*、*oqxA*、*MdtQ*、*H-NS*、*marA*、*Klebsiella pneumoniae OmpK37*、*OmpA*、*msbA*、*vanG*、*leuO*、*FosA6*、*eptB*、*ArnT*、*CRP*、*adeF*、*rsmA*、*Klebsiella pneumoniae KpnH*、*Klebsiella pneumoniae KpnG*、*emrR*、*adeF*、*adeF*。其中, 前 6 种耐药基因属于 perfect 标准, 其他属于 strict 标准。

利用 NCBI 网站对以上 24 种耐药基因进行检索, 获得 4 种耐药基因 (*SHV-11*、*MdtQ*、*H-NS*、*FosA6*) 的引物序列。最终, 4 种耐药基因的引物由 Primer Premier 6 软件进行设计 (表 1), 并送往生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。以肺炎克雷伯氏菌基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 检测耐药基因。PCR 反应体系: 2×Taq PCR Master Mix 5 μL, 上、下游引物 (100 μmol/L) 各 0.6 μL, DNA 模板 0.8 μL, ddH₂O 补足 10 μL。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增完成后, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳来判断结果。

2 结果与分析

2.1 菌株 KPHN001 基因组的一般特征

利用 ONT 和 Illumina 产生的序列数据进行从头组装。经过适配接头的修剪和低质量读数的过滤后, 获得了 KP 的有效数据, 并通过 Illumina 测序数据进行校正, 最终得到了菌株 KPHN001 的完整基因组(图 1)。最后, 本研究将基因组序列及其注释信息进行了整合(表 2)。

利用 ONT 和 Illumina 对数据进行组装、修

剪、过滤和校正, 成功获得了菌株 KPHN001 的全基因组测序信息(图 1)。其中, 全基因组圈图的最外侧坐标表示基因组序列对应的位置, 向内圈层分别是正链基因、负链基因、ncRNA (黑色表示 tRNA, 红色表示 rRNA)、G+C 含量(红色表示大于均值, 蓝色表示小于均值)和 G+C 偏移(紫色表示大于 0, 橙色表示小于 0)。将全基因组测序数据及其注释信息进行整合, 详细内容见表 2。

表 1 本研究的引物信息
Table 1 Primer information in this study

抗生素种类 Type of Antibiotic	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物大小 Product size (bp)	参考文献 Reference
头孢菌素 Cephalosporin	SHV-11	F: GCTGTTATCGCTCATGGTA R: TTCGCCTGTGTATTATCTCC	55	377	[37]
多种抗生素 Multi-antibiotics	MdtQ	F: CGAGGTCAGTTGAATGCTA R: GCGGAGAACGATATTAACG	55	711	[38]
膦酸类 Phosphonic acids	FosA6	F: ATGCTGAGTGGACTGAATC R: ATCGGCTTCGCTAATACTAA	55	228	[37]
多种抗生素 Multi-antibiotics	H-NS	F: GCCCAGCCTTTGTATTCA R: GCAGCAGTTTGAGTGGAT	55	279	[39]

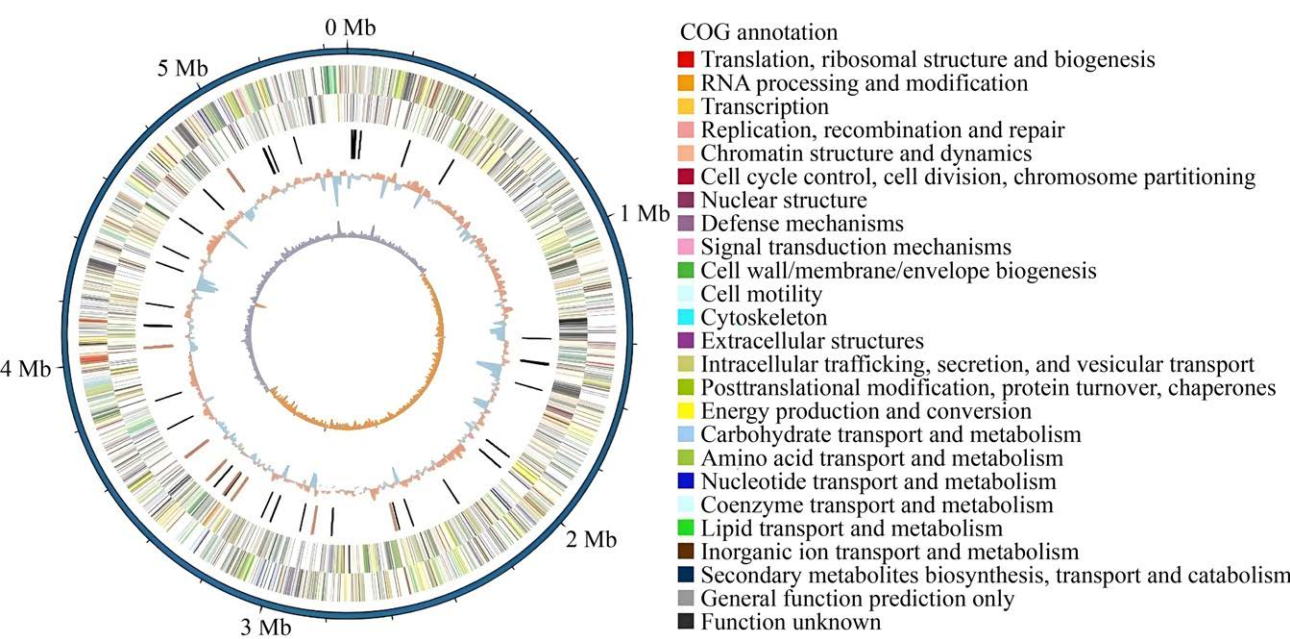


图 1 菌株 KPHN001 的全基因组圈图
Figure 1 Whole genome circle map of strain KPHN001.

表 2 菌株 KPHN001 的注释信息

Table 2 Annotation information of strain KPHN001

项目 Item	数量 Quantity
基因大小 Gene size (bp)	2 668 660 601
基因总长度 Total gene length (bp)	5 470 968
G+C 含量 G+C content (%)	56.66
编码基因 Coding gene	5 135
基因岛 Gene island	14
编码区总长度 Total length of code area (%)	4 764 579
基因岛总长度 Total length of gene island (bp)	362 874
串联重复序列 Tandem repeat	116
rRNA	25
tRNA	86
sRNA	58
SINEs	39
LINEs	29
CRISPR	2
前噬菌体 Prophage	3
前噬菌体总长度 Total prophage length (pb)	110 978

2.2 基因功能分析

2.2.1 KEGG 注释

菌株 KPHN001 的 KEGG 注释结果显示, 3 321 个基因被注释为具有功能信息, 占基因组的 64.67%, 其中, 与代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、生物系统相关的基因数量百分比结果见表 3。结果表明, 在 KEGG 功能注释中, 与代谢通路相关的基因最多, 其中包括碳水化合物代谢(12.57%)与氨基酸代谢(8.37%)。此外, 还发现 40 个基因与萜类及聚酮化合物的代谢相关(图 2)。

2.2.2 GO 注释

菌株 KPHN001 的 GO 注释结果如图 3 所示。在生物过程中, 细胞过程(cellular process)、单生物体过程(single-organism process)和代谢过程(metabolic process)是基因富集程度最高的

表 3 菌株 KPHN001 的 KEGG 注释结果

Table 3 KEGG annotation results of strain KPHN001

通路 Pathway	百分比 Percentage (%)
代谢 Metabolism	72.07
遗传信息处理 Genetic information processing	6.14
环境信息处理 Environmental information processing	14.96
细胞过程 Cellular process	5.11
生物系统 Organismal systems	0.30

3 个途径, 分别富集了 3 811、3 466 和 3 270 个基因; 在细胞组成中, 细胞(cell)和细胞部分(cell part)是富集程度最高的 2 个途径, 分别富集了 3 110 个和 3 106 个基因; 在分子功能中, 结合(binding)和催化活性(catalytic activity)是富集程度最高的 2 个途径, 分别富集了 2 645 个和 2 983 个基因。

2.2.3 COG 注释

有 4 075 个蛋白质编码基因被注释到 COG 数据库中 25 个类别中(图 4)。在这 4 075 个基因中, 586 个与氨基酸运输和代谢相关的基因, 536 个与碳水化合物运输和代谢相关的基因, 440 个转录相关基因, 386 个与无机离子转运和代谢相关的基因。这一结果与 KEGG 代谢通路分析的结果相似, 大量基因参与细菌维持基本生命的新陈代谢过程。

2.2.4 CAZy 注释

菌株 KPHN001 的 CAZy 注释结果显示(图 5), 772 个基因被注释到相关酶类中, 包括 350 个与糖苷水解酶(glycoside hydrolases)相关的基因, 290 个与糖基转移酶(glycosyl transferases)相关的基因, 81 个与碳水化合物酶结合模块(carbohydrate-binding modules)相关的基因, 41 个与碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases)相关的基因, 6 个与辅助活性(auxiliary activities)相关的基因, 以及 4 个与多糖裂解酶(polysaccharide lyases)相关的基因。

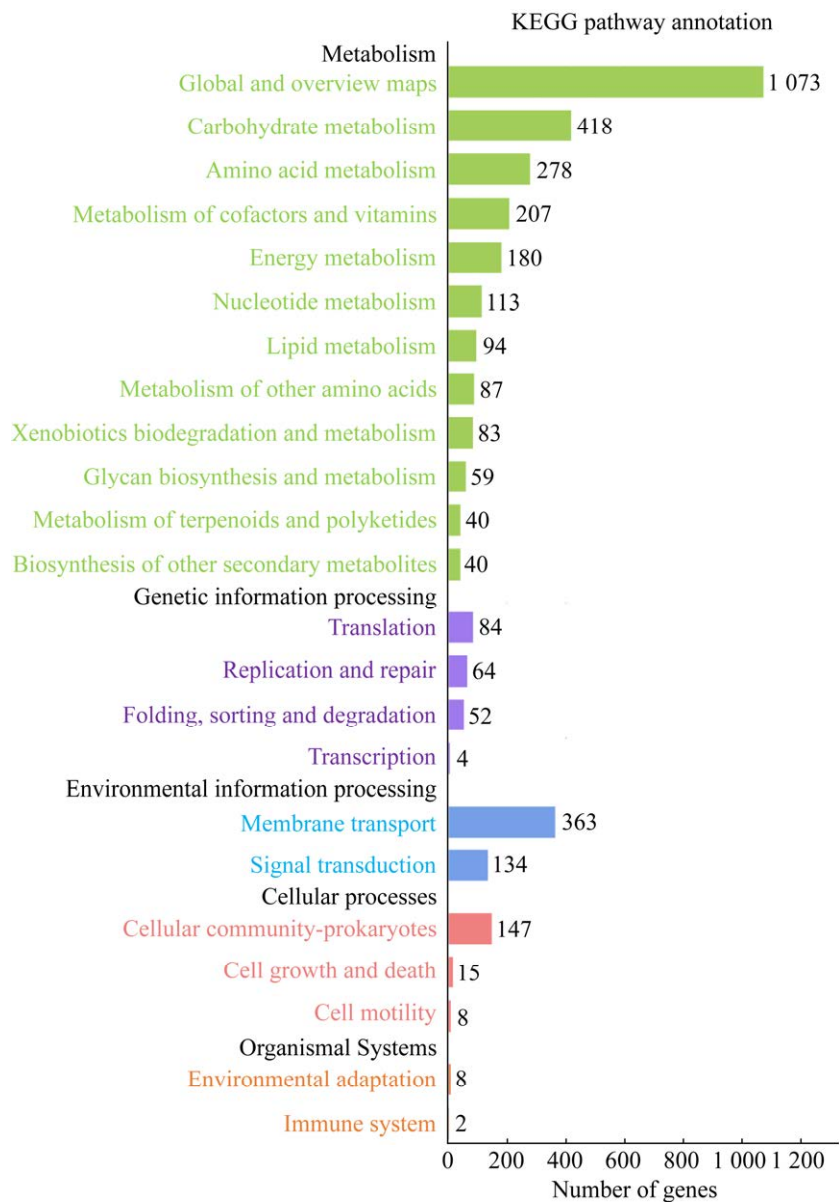


图 2 KEGG 注释结果统计图 横轴表示基因数量，纵轴表示 KEGG 功能注释的分类。
Figure 2 Statistical graph of KEGG annotation results. The horizontal axis represents the number of genes, and the vertical axis represents the functional classification of the KEGG database.

2.3 比较基因组分析

2.3.1 同源基因系统发育树

为揭示不同来源的肺炎克雷伯氏菌的遗传差异、进化关系和功能特性，从 NCBI 网站获取 6 株肺炎克雷伯氏菌进行基因组级别的比较(表 4)，构建同源基因系统发育树。

菌株 KPHN001 的系统发育树显示，菌株

KPHN001 与菌株 HS11286 处在同一分支，进化关系最近(图 6)。系统发育树还展示了菌株 DSM 30104、ASM 159094v1、ATCC 13883 和 NCTC 9633 这 4 个基因组形成了一个相对紧密的分支，表明它们在基因组结构上具有高度的保守性。此外，菌株 KPHN001 与 HS11286 在树中的分支较为独立，提示这 2 个基因组可能经历了不

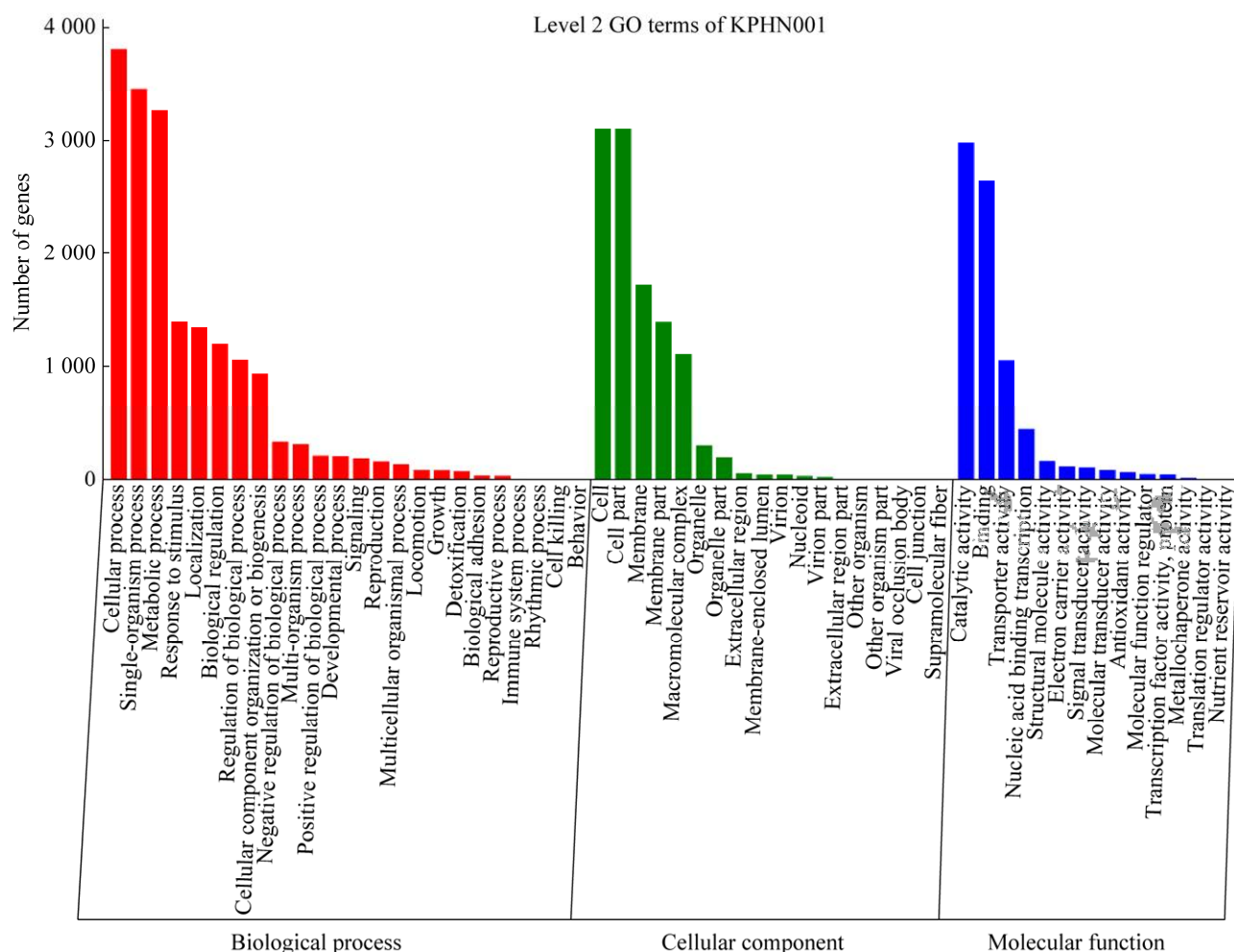


图3 菌株 KPHN001 的 GO 功能注释

Figure 3 GO function annotation of strain KPHN001.

同的适应性进化。这一观察为推测各基因组的遗传背景和适应性机制提供了重要线索。

2.3.2 共线性分析

对5个肺炎克雷伯氏菌株的基因组进行了共线性分析,结果显示各基因组之间的遗传保守性和变异(图7)。通过比较菌株 KPHN001 与其他4个基因组(DSM 30104、ATCC 13883、ASM 159094v1 和 NCTC 9633)时,发现其相似度分别为 87.22%、86.97%、87.34%和 86.45%。这些结果表明,各基因组之间尽管存在一定程度的遗传变异,整体上各基因组之间仍然表现出较高的保守性。这些保守区域的存在可能指示它们在功能上具有相似的特征。特别是菌株 HS11286

与菌株 KPHN001 之间的相似度更是达到 91.63%,突出显示了这2个基因组在结构上显著的相似性和进化联系。

2.3.3 基因家族分析

菌株 KPHN001 的基因家族分析结果显示(图8),6个菌株具有4177个共有的基因家族,总计19247个保守基因。其中,菌株 HS11286 包含593个特有基因、菌株 ATCC 13883 包含14个特有基因、菌株 ASM 159094v1 包含32个特有基因、菌株 NCTC 9633 包含17个特有基因、菌株 DSM 30104 包含8个特有基因,以及菌株 KPHN001 包含362个特有基因。结果表明,在这6个菌株之间多数是保守基因,仅有少数基

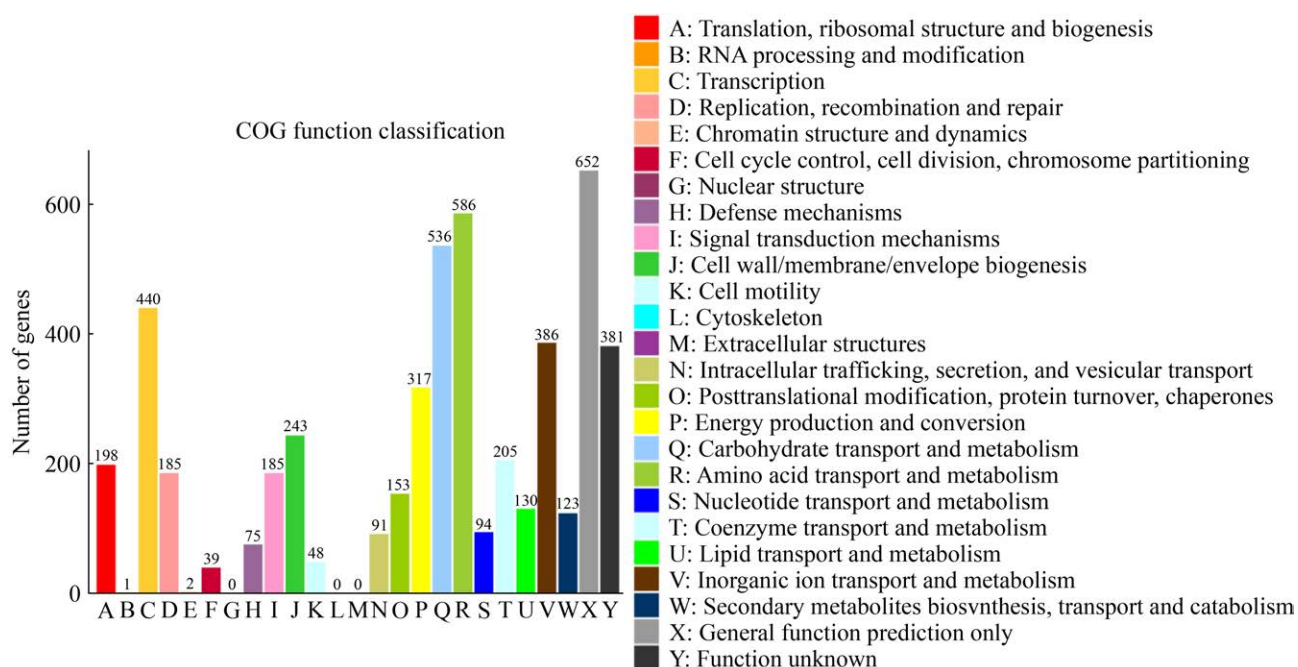


图 4 菌株 KPHN001 的 COG 功能注释 横轴表示功能分类，纵轴表示每种功能分类的基因数量。

Figure 4 COG functional annotation of strain KPHN001. The horizontal axis represents functional classification, and the vertical axis represents the number of genes in each functional classification.

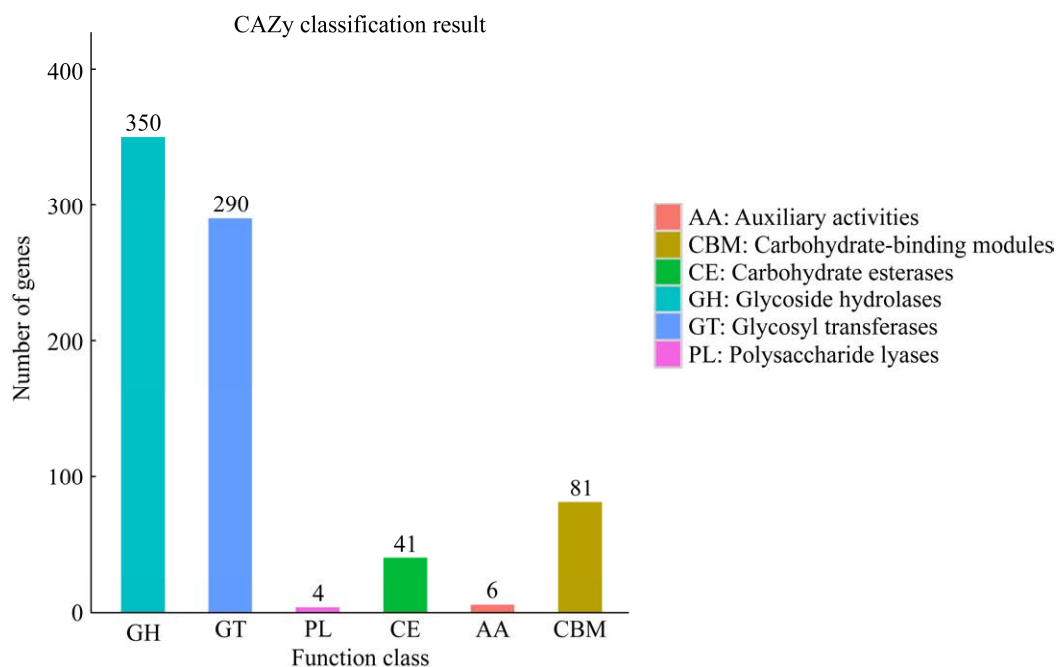


图 5 菌株 KPHN001 的 CAZy 分类统计图 横轴表示酶的分类，纵轴表示该分类包含的基因数。

Figure 5 CAZy classification of strain KPHN001. The horizontal axis represents the classification of enzymes, and the vertical axis represents the number of genes contained in that classification.

表 4 六株肺炎克雷伯氏菌的基本信息

Table 4 Basic information of 6 strains of *Klebsiella pneumoniae*

GenBank 登录号	毒株编号	年份	宿主	来源
GenBank accession number	Strain code	Year	Host	Source
PRJNA863221	KPHN001	2021	山羊 <i>Capra hircus</i>	NCBI
GCA_000240185.2	HS11286	2011	人类 <i>Homo sapiens</i>	NCBI
GCA_000281755.1	DSM 30104	2012	人类 <i>Homo sapiens</i>	NCBI
GCF_001590945.1	ASM 159094v1	2016	人类 <i>Homo sapiens</i>	NCBI
GCA_000240185.2	ATCC 13883	2011	人类 <i>Homo sapiens</i>	NCBI
GCF_900452045.1	NCTC 9633	2018	人类 <i>Homo sapiens</i>	NCBI

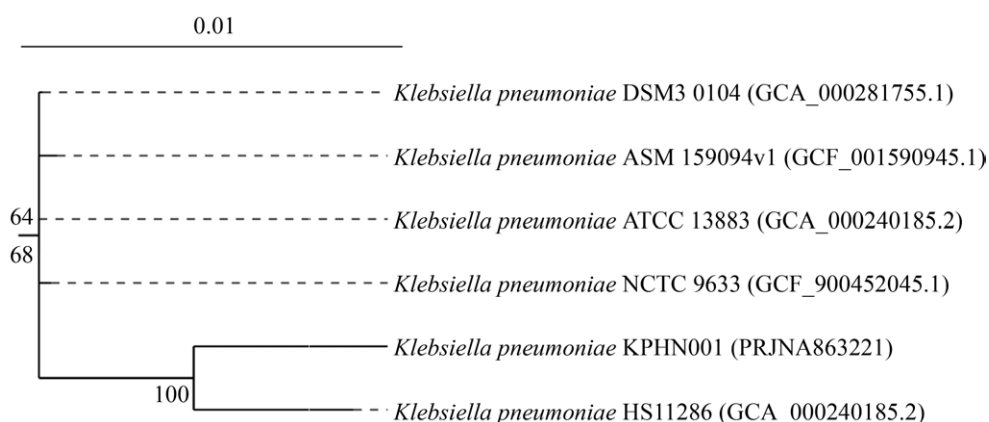


图 6 同源单拷贝基因系统发育树 最上方有一个标度条, 标度为 0.01, 表示进化距离的单位。100、64、68 表示进化距离。

Figure 6 Phylogenetic tree of homologous single copy genes. At the very top is a scale bar with a scale of 0.01, representing a unit of evolutionary distance. 100, 64, and 68 are evolutionary distances.

因是特有的。特别是, 菌株 DSM 30104、ATCC 13883 和 NCTC 9633 的特有基因最少, 菌株 ASM 159094v1 排在其次, 表明这些菌株之间的遗传分化程度相对较低。

2.3.4 ANI 分析结果

利用 ANI 分析对不同基因组之间的相似性进行比对, 结果如图 9 所示。热图显示了各基因组之间的相似度, 数值接近 1 的区域表示高度相似。其中, 菌株 DSM 30104、ASM 159094v1、ATCC 13883 和 NCTC 9633 的相似度均高于 0.999, 显示出它们之间的密切关系。相比之下, 菌株 KPHN001 与 HS11286 的相似度较低, 这与它们在系统发育树中的独立分支位置相一致, 提示它们可能存在显著的遗传变异。

整体结果突显了各基因组间的保守性与变异性的共存, 为理解 *Klebsiella pneumoniae* 的遗传多样性和进化历史提供了重大的数据支持。

2.4 耐药基因及 PCR 结果

对选取的相关耐药基因进行 PCR 检测, 检测结果如图 10 所示。本研究中总共筛选了 4 个耐药基因, PCR 验证出了 *SHV-11*、*H-NS*、*FosA*、*MdtQ* 这 4 个耐药基因。

3 讨论

针对肺炎克雷伯氏菌 KPHN001 进行基因组测序, 功能注释结果显示, 菌株 KPHN001 的 3 321 个基因中, 64.67% 具备功能信息, 并且代谢过程相关基因占比达 72.07%。这一数据

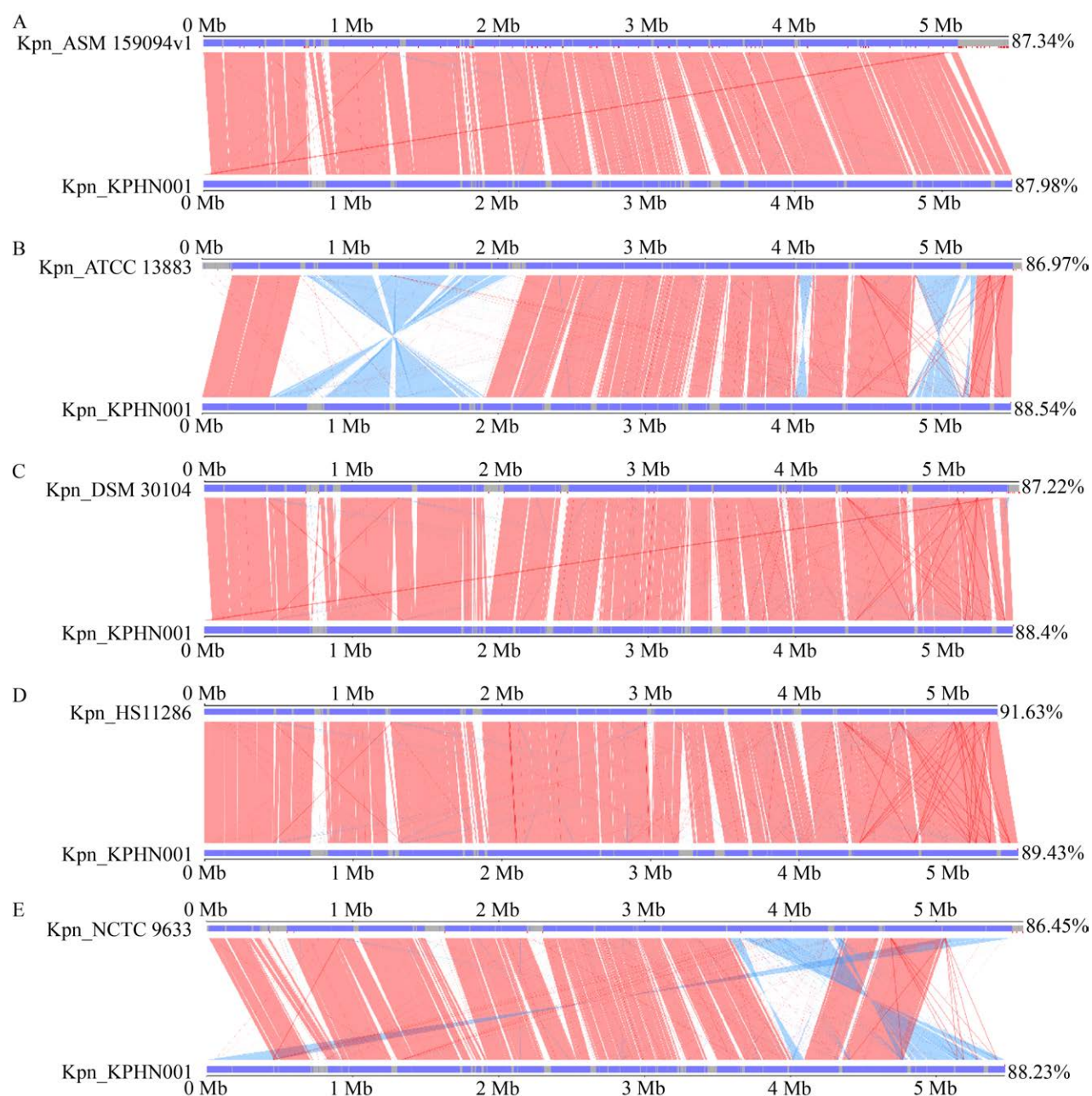


图 7 菌株 KPHN001 与其他菌株的共线性分析结果 A: 菌株 ASM 159094v1 vs. 菌株 KPHN001; B: 菌株 ATCC 13883 vs. 菌株 KPHN001; C: 菌株 DSM 30104 vs. 菌株 KPHN001; D: 菌株 HS11286 vs. 菌株 KPHN001; E: 菌株 NCTC 9633 vs. 菌株 KPHN001。上轴为目标物种基因组, 下轴为参考基因组。红色线条与对应区域正向匹配; 蓝色线条与对应区域反向匹配。

Figure 7 Results of collinearity analysis between strain KPHN001 and other strains. A: Strain ASM 159094v1 vs. KPHN001; B: Strain ATCC 13883 vs. KPHN001; C: Strain DSM 30104 vs. KPHN001; D: Strain HS11286 vs. KPHN001; E: Strain NCTC 9633 vs. KPHN001. The top axis is the target species genome, and the bottom axis is the reference genome. Red line is positively matched with the corresponding area; Blue line is reversed with the corresponding area.

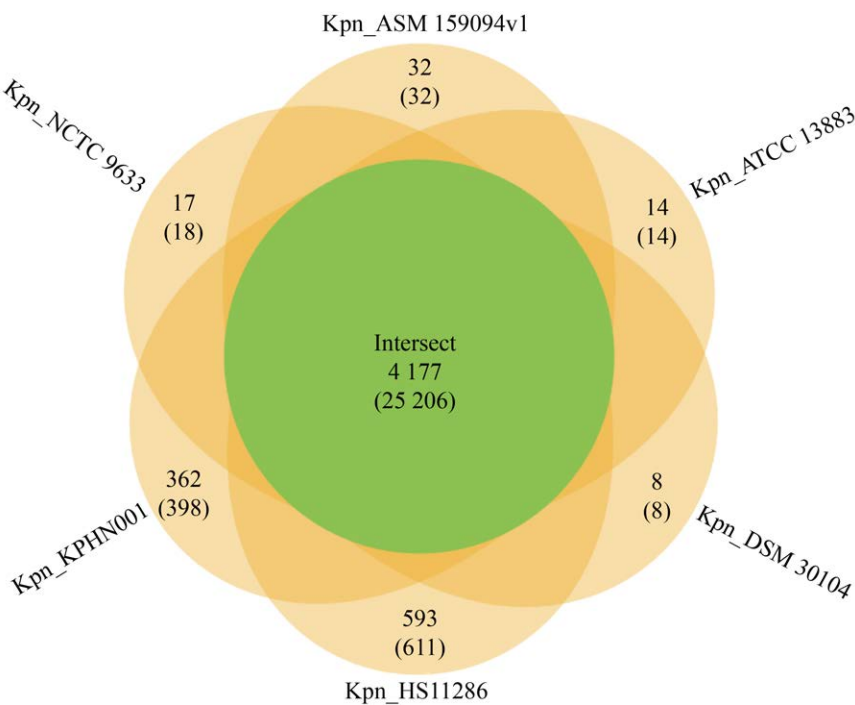


图 8 同源基因家族韦恩图 每个椭圆表示一个基因组，每个区域上方的数字表示此区域内物种的基因家族个数，括号中数字为此区域中基因家族的总基因个数。
Figure 8 Venn Diagram of homologous gene families. Each oval represents a genome, the number above each region indicates the number of gene families in the species in that region, and the number in square brackets below indicates the total number of genes in the species in that region.

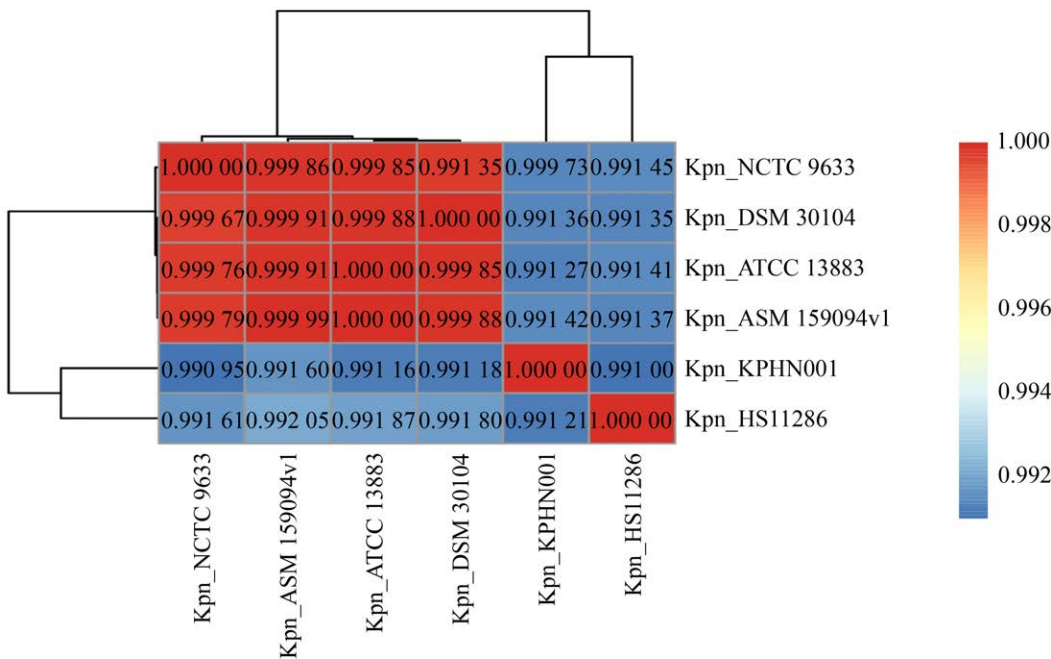


图 9 ANI 分析的热图
Figure 9 Heat map of ANI analysis.

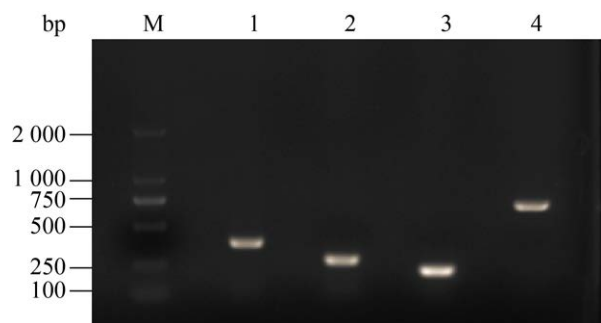


图 10 菌株 KPHN001 耐药基因 PCR 结果

Figure 10 PCR Results of Resistance Genes in KPHN001 Strain. M: DL2000 DNA marker; 1: *SHV-11*; 2: *H-NS*; 3: *FosA*; 4: *MdtQ*.

突显了菌株 KPHN001 在碳水化合物和氨基酸代谢方面的显著特征,反映其在营养获取和利用方面的高度适应性,并提示宿主微环境是支持细菌生长的营养物质的重要来源^[40]。

进一步的 CAZy 注释表明,菌株 KPHN001 中富集多种活性酶,尤其是糖苷水解酶和糖基转移酶,提示其在碳水化合物的降解和转化中可能发挥重要作用。同时,GO 分析强调该菌株在细胞过程和生物过程中的多个基因的高富集程度,突出其在细胞结构和生理功能中的重要性。肺炎克雷伯氏菌的菌毛是细菌细胞的另一种成分,通过介导病原体黏附到下尿路、呼吸道和胃肠道的黏膜层或上皮细胞上来帮助致病性^[41]。这进一步支持了 KEGG 分析的结果,表明该菌株在细胞功能和代谢功能方面具有显著的基因组特征。

通过 COG 数据库的分析,菌株 KPHN001 在氨基酸及碳水化合物运输和代谢、转录及无机离子转运方面的基因数量较高,表明其在适应环境变化方面具备优势。这与 KEGG 的代谢通路分析结果一致,即菌株 KPHN001 在对环境信息处理方面的基因富集达到 14.96%,这表明其在适应不同环境刺激及外界变化的能力,也为其在自然生态系统或临床感染中的潜在生存策略提供了基础。这种适应能力与其致病性和生态适应性密切相关,表明菌株 KPHN001 在进

化过程中可能获得了应对抗生素压力及宿主免疫反应的调控机制。

菌株 KPHN001 的系统发育树分析显示,它与 HS11286 处于同一分支,表明二者的进化关系接近。这一结果与 5 个 *Klebsiella pneumoniae* 基因组的共线性分析一致,尽管存在一定遗传变异,整体展现出较高的保守性,反映出它们在功能特性上的相似性。菌株 KPHN001 与其他基因组的相似度较高,而菌株 KPHN001 与 HS11286 的相似度偏低,暗示二者之间可能存在显著的遗传变异。热图分析显示,与其他基因组之间的相似度高,表明它们的关系密切。3 个分析结果共同揭示了 *Klebsiella pneumoniae* 各个基因组之间保守性与变异性的共存,为理解其遗传多样性与进化历史提供了重要的数据支持。通过这两种分析,我们能够更全面地探讨不同基因组之间的关系及其对适应性进化的潜在影响。

基因家族分析显示,菌株 KPHN001 与其他 5 个菌株在基因家族上的保守性较高,共有 4 177 个基因家族在所有菌株中存在。菌株 KPHN001 与其他菌株相比具有较多的共享基因,说明其在不同菌株中保守基因的数量较多,遗传变异程度较低。这也反映了肺炎克雷伯氏菌株之间遗传背景的相似性和稳定性。肺炎克雷伯氏菌的遗传灵活性是它们能够获得抗菌素耐药性的决定因素^[42]。

在本研究中,我们对选取的相关耐药基因进行了 PCR 检测,并成功筛选出 4 个耐药基因,包括 *SHV-11*、*H-NS*、*FosA* 和 *MdtQ*,这些基因的存在表明该菌株具备一定的耐药性。同时,相关研究表明菌株 KPHN001 对多黏菌素 B 和呋喃唑酮敏感,对青霉素、头孢拉定、氧氟沙星、庆大霉素等 28 种药物呈现不同程度耐药^[18],也证明了菌株 KPHN001 是多重耐药菌。肺炎克雷伯氏菌为机会致病菌,可感染动物,这一现象在文献中已有较多报道^[43-45]。随着养羊业的发展,肺炎克雷伯氏菌在羊群中的感染病例逐渐

增多,尤其是在饲养密集和管理不善的环境中感染风险更高。这一问题在全球范围内的复杂性因地区差异而有所不同,热带地区如海南由于其特有的高温高湿气候,对肺炎克雷伯氏菌的生存与传播具有特殊影响,这为相关研究带来了挑战。

本研究的结果显示菌株 KPHN001 在代谢功能和环境适应能力上具备显著特征,其遗传背景的相似性与差异性为后续研究提供了新视角。这些重要发现不仅为进一步理解肺炎克雷伯氏菌的生物学功能提供了基础,还为研究其在临床和环境中的作用奠定了基础,期待未来在不同环境和条件下对菌株 KPHN001 的表征进行深入探究,揭示其在肺炎克雷伯氏菌群体中的生态角色与进化意义。

4 结论

本研究深入探讨了羊肺炎克雷伯氏菌 KPHN001 的基因组特征及其在代谢与耐药性方面的重要性。基因组功能注释显示,菌株 KPHN001 在代谢过程中具有显著的优势,尤其在碳水化合物和氨基酸代谢方面,反映出其对环境的高度适应能力。此外,菌株 KPHN001 与 HS11286 的进化关系表明,二者可能共享相似的遗传特征和生态适应性。通过 PCR 技术筛选出 *SHV-11*、*H-NS*、*FosA* 和 *MdtQ* 这 4 个耐药基因,强调了该菌株在机会致病菌中的作用。这些发现为理解肺炎克雷伯氏菌的生物学功能提供了重要的基础,也为制定有效的防控策略提供了新的视角。未来的研究应进一步探究 KPHN001 在不同生态环境中的表征及其潜在的临床危害,以便更好地应对肺炎克雷伯氏菌带来的公共健康挑战。

作者贡献声明

兰凤:全基因组、比较基因组测序及分析、撰写文章、修改文章;杨映雪:部分图片制作及文献查阅;徐乐:文献查阅;李世元:部分

数据整理与分析;李素雅:文献查阅;焦玉清:部分数据整理与分析;陈思、陈巧玲、满初日嘎、杜丽:文章选题、文章的指导;王凤阳、高宏岩:文章设计,文章的指导、审阅、修改,实验经费资助。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] LIU SL, WANG XB, GE JJ, WU XB, ZHAO Q, LI YM, WANG RS. Analysis of carbapenemase-resistant genotypes of highly virulent *Klebsiella pneumoniae* and clinical infection characteristics of different MLST types[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 2021: 3455121.
- [2] WANG GY, ZHAO G, CHAO XY, XIE LX, WANG HJ. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(17): 6278.
- [3] 王雅丽, 张宝锁, 张雯, 崔生玲, 卿素珠, 杨奇, 张为民. 鸡源肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定和耐药性分析[J]. 中国兽药杂志, 2022, 56(11): 1-9.
- [4] WANG YL, ZHANG BS, ZHANG W, CUI SL, QING SZ, YANG Q, ZHANG WM. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Klebsiella pneumoniae* from chickens[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2022, 56(11): 1-9 (in Chinese).
- [5] ESTELL KE, YOUNG A, KOZIKOWSKI T, SWAIN EA, BYRNE BA, REILLY CM, KASS PH, ALEMAN M. Pneumonia caused by *Klebsiella* spp. in 46 horses[J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2016, 30(1): 314-321.
- [6] BOWRING BG, FAHY VA, MORRIS A, COLLINS AM. An unusual culprit: *Klebsiella pneumoniae* causing septicaemia outbreaks in neonatal pigs?[J]. Veterinary Microbiology, 2017, 203: 267-270.
- [7] BMJ PUBLISHING GROUP LIMITED. *Klebsiella pneumoniae* infection causes mastitis in pigs[J]. Veterinary Record, 2014, 175(24): 617-620.
- [8] 张自强, 王佳佳, 任玉莹, 朱慧杰, 张倩文, 刘玉梅. 兔源支气管败血波氏杆菌和肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定及其对抗菌药物的敏感性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(8): 2254-2264.
- [9] ZHANG ZQ, WANG JJ, REN YY, ZHU HJ, ZHANG QW, LIU YM. Isolation and identification of rabbit-derived *Bordetella bronchiseptica* and *Klebsiella pneumoniae* and their antimicrobial susceptibility analysis[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2021, 52(8): 2254-2264 (in Chinese).
- [10] 李敏, 苏小艳, 李学英, 张焕容. 大熊猫源肺炎克雷伯氏菌生物学特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5206-5221.
- [11] LI M, SU XY, LI XY, ZHANG HR. Isolation,

- identification, and biological characterization of *Klebsiella pneumoniae* from *Ailuropoda melanoleuca*[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5206-5221 (in Chinese).
- [9] TWENHAFEL NA, WHITEHOUSE CA, STEVENS EL, HOTTEL HE, FOSTER CD, GAMBLE S, ABBOTT S, JANDA JM, KREISELMEIER N, STEELE KE. Multisystemic abscesses in African green monkeys (*Chlorocebus aethiops*) with invasive *Klebsiella pneumoniae*: identification of the hypermucoviscosity phenotype[J]. Veterinary Pathology, 2008, 45(2): 226-231.
- [10] MICHAEL SA, HAYMAN DTS, GRAY R, ROE WD. Clinical parameters of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* disease and ivermectin treatment in New Zealand sea lion (*Phocarcos hookeri*) pups[J]. PLoS One, 2022, 17(3): e0264582.
- [11] 陈强, 程悦宁, 冯秋菊, 郭利, 张淑琴, 谭斌, 易立, 赵权, 程世鹏, 孙娜. 水貂肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(2): 700-708.
- CHEN Q, CHENG YN, FENG QJ, GUO L, ZHANG SQ, TAN B, YI L, ZHAO Q, CHENG SP, SUN N. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Klebsiella pneumoniae* from minks[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(2): 700-708 (in Chinese).
- [12] 韩坤, 孟祥玉, 白雪, 闫喜军, 冯二凯, 佟盼盼, 吕娇, 于莹, 陈立志. 狐狸源肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定及毒力检测[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(4): 722-727.
- HAN K, MENG XY, BAI X, YAN XJ, FENG EK, TONG PP, LYU J, YU Y, CHEN LZ. Isolation, identification and virulence factors detection of *Klebsiella pneumoniae* isolated from fox[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2019, 39(4): 722-727 (in Chinese).
- [13] CHENG J, ZHANG J, HAN B, BARKEMA HW, COBO ER, KASTELIC JP, ZHOU M, SHI YX, WANG JF, YANG R, GAO J. *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine mastitis is cytopathogenic for bovine mammary epithelial cells[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(4): 3493-3504.
- [14] KOMATSU T, YOSHIDA E, SHIGENAGA A, YASUIE N, UCHIYAMA S, TAKAMURA Y, SUGIE K, KIMURA K, HARITANI M, SHIBAHARA T. Fatal suppurative meningoencephalitis caused by *Klebsiella pneumoniae* in two calves[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2021, 83(7): 1113-1119.
- [15] BAO QH, LIU WJ, YU J, WANG WH, QING MJ, CHEN X, WANG F, ZHANG JC, ZHANG WY, QIAO JM, SUN TS, ZHANG HP. Isolation and identification of cultivable lactic acid bacteria in traditional yak milk products of Gansu Province in China[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2012, 58(2): 95-105.
- [16] 张凯川, 王晋宇, 李守军, 贾坤. 广东省羊源肺炎克雷伯氏菌遗传进化与毒力基因及耐药性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(1): 328-337.
- ZHANG KC, WANG JY, LI SJ, JIA K. Isolation, identification and biological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from sheep in Guangdong Province[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2023, 54(1): 328-337 (in Chinese).
- [17] GUO YM, ZHOU HJ, QIN LY, PANG ZZ, QIN T, REN HY, PAN Z, ZHOU JK. Frequency, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in food samples[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153561.
- [18] 何美荣. 羊源 K57 荚膜型肺炎克雷伯氏菌的微生物学特性及致病性分析[D]. 海南: 海南大学硕士学位论文, 2023.
- HE MEIRONG. Microbiological characteristics and pathogenicity analysis of serotype K57 *Klebsiella pneumoniae* isolated from goat[D]. Hainan: Master's Thesis of Hainan University, 2023 (in Chinese).
- [19] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. Bioinformatics, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [20] TARAIOLO-GRAOVAC M, CHEN NS. Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2009, Chapter 4: 4.10.1-4.10.14.
- [21] BENSON G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(2): 573-580.
- [22] LAGESEN K, HALLIN P, RØDLAND EA, STAERFELDT HH, ROGNES T, USSERY DW. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(9): 3100-3108.
- [23] LOWE TM, CHAN PP. tRNAscan-SE on-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(W1): W54-W57.
- [24] NAWROCKI EP, EDDY SR. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches[J]. Bioinformatics, 2013, 29(22): 2933-2935.
- [25] GRISSA I, VERGNAUD G, POURCEL C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(Web Server issue): W52-W57.
- [26] FOUTS DE. Phage Finder: automated identification and classification of prophage regions in complete bacterial genome sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(20): 5839-5851.
- [27] CONESA A, GÖTZ S, GARCÍA-GÓMEZ JM, TEROL J, TALÓN M, ROBLES M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. Bioinformatics, 2005, 21(18): 3674-3676.
- [28] BUCHFINK B, REUTER K, DROST HG. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND[J]. Nature Methods, 2021, 18(4): 366-368.
- [29] ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 215(3): 403-410.
- [30] KURTZ S, PHILLIPPY A, DELCHER AL, SMOOT M, SHUMWAY M, ANTONESCU C, SALZBERG SL. Versatile and open software for comparing large genomes[J]. Genome Biology, 2004, 5(2): R12.
- [31] GOEL M, SUN HQ, JIAO WB, SCHNEEBERGER K. SyRI: finding genomic rearrangements and local sequence differences from whole-genome assemblies[J]. Genome Biology, 2019, 20(1): 277.

- [32] LI L, STOECKERT CJ Jr, ROOS DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes[J]. *Genome Research*, 2003, 13(9): 2178-2189.
- [33] NGUYEN LT, SCHMIDT HA, von HAESLER A, MINH BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32(1): 268-274.
- [34] EDGAR RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity[J]. *BMC Bioinformatics*, 2004, 5: 113.
- [35] CASTRESANA J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(4): 540-552.
- [36] PRITCHARD L, GLOVER RH, HUMPHRIS S, ELPHINSTONE JG, TOTH IK. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens[J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(1): 12-24.
- [37] KERDSIN A, AKEDA Y, HATRONJIT R, DETCHAWNA U, SEKIZAKI T, HAMADA S, GOTTSCHALK M, OISHI K. *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2014, 63(Pt 6): 824-830.
- [38] FAN FF, WANG JQ, CHEN H, WEI L, ZHANG Z. Isolation and protein MdtQ analysis of outer membrane vesicles released by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 183: 106325.
- [39] CHEN YB, HUANG JX, CHEN HD, XIAO H, SHEN XQ, CHEN QQ, ZHANG ZS, HUANG Y, WU SL, CHEN DJ. Whole genome sequencing analysis of seven unknown resistance mechanisms of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains resistance to ceftazidime-avibactam[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2024, 135(6): 1xae135.
- [40] CESUR MF, SIRAJ B, UDDIN R, DURMUŞ S, ÇAKIR T. Network-based metabolism-centered screening of potential drug targets in *Klebsiella pneumoniae* at genome scale[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 9: 447.
- [41] MUKHERJEE S, MITRA S, DUTTA S, BASU S. Neonatal sepsis: the impact of carbapenem-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Frontiers in Medicine*, 2021, 8: 634349.
- [42] GOMEZ-SIMMONDS A, UHLEMANN AC. Clinical implications of genomic adaptation and evolution of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2017, 215(suppl_1): S18-S27.
- [43] YANG XR, LIU L, WANG ZQ, BAI L, LI RC. Emergence of mcr-8.2-bearing *Klebsiella quasipneumoniae* of animal origin[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, 74(9): 2814-2817.
- [44] WANG GY, ZHAO G, CHAO XY, XIE LX, WANG HJ. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(17): 6278.
- [45] ARATO V, RASO MM, GASPERINI G, SCORZA FB, MICOLI F. Prophylaxis and treatment against *Klebsiella pneumoniae*: current insights on this emerging anti-microbial resistant global threat[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022(8): 4042.