

氨苄西林胁迫下阪崎克罗诺杆菌维持连续休眠态的转录组学分析

莫云少^{1,2}, 张竞丰^{1,2}, 敖嘉璐¹, 刘园园^{1,2}, 陈楚欣^{1,2}, 赵力超^{1,2*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)

摘要: 阪崎克罗诺杆菌是奶粉中常见的食源致病菌, 在压力胁迫下会进入连续休眠态。该研究通过转录组测序技术分析氨苄西林压力胁迫下形成的连续休眠态菌的基因表达变化差异, 共筛选出 220 个显著上调基因和 416 个显著下调基因; 并对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。结果表明, 与代谢活性、运动能力(鞭毛合成)、细胞分裂相关基因表达整体显著下调; 与药物外排泵、细胞形态改变相关的部分基因表达显著上调; GO 富集分析结果还提示严谨反应、毒素抗毒素系统(TAS)相关基因表达显著上调, TAS 可能通过调控下游 mRNA 和 NAD⁺ 促进连续休眠态的形成。因此, 在氨苄西林胁迫下严谨反应可能通过级联调节激活 TAS 表达, 从而促进连续休眠态形成。在该状态下, 阪崎克罗诺杆菌通过降低代谢活性、减弱运动能力、抑制细胞分裂, 同时改变细胞形态, 并增强药物外排能力, 从而维持连续休眠态。研究结果为防控压力胁迫下产生的连续休眠态阪崎克罗诺杆菌奠定了理论基础。

关键词: 氨苄西林; 阪崎克罗诺杆菌; 连续休眠态; 转录组

文章编号: 1673-9078(2023)05-72-80

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.5.0500

Transcriptomic Analysis of *Cronobacter sakazakii* Maintaining Dormancy Continuum under Ampicillin Stress

MO Yunshao^{1,2}, ZHANG Jingfeng^{1,2}, AO Jialu¹, LIU Yuanyuan^{1,2}, CHEN Chuxin^{1,2}, ZHAO Lichao^{1,2*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Cronobacter sakazakii* is a common food-borne pathogen in milk powder, which enters the state of dormancy continuum under stress. Transcriptome sequencing was used in the present study to analyze the changes in gene expression in bacteria maintaining dormancy continuum formed under ampicillin stress. A total of 220 and 416 genes were significantly upregulated and downregulated, respectively. Next, GO and KEGG enrichment analyses were performed on differentially expressed genes. Genes related to metabolic activity, motility (flagellar synthesis), and cell division were significantly downregulated in general. Meanwhile, certain genes related to drug efflux pumps and cell morphological changes were significantly upregulated. Similarly, the GO enrichment analysis indicated that genes related to the stringent response and toxin-antitoxin system (TAS) were significantly upregulated. In particular, TAS may promote the formation of dormancy continuum by regulating downstream mRNAs and NAD⁺. Therefore, stringent response under ampicillin stress may activate TAS expression through cascade regulation, thereby promoting the formation of dormancy continuum. Under stress, *C. sakazakii* maintains dormancy continuum by reducing metabolic activity, weakening motility, inhibiting cell division, changing cell morphology, and enhancing drug efflux. These findings lay a theoretical foundation for the prevention and control of the dormancy continuum of *C. sakazakii* under stress.

引文格式:

莫云少,张竞丰,敖嘉璐,等.氨苄西林胁迫下阪崎克罗诺杆菌维持连续休眠态的转录组学分析[J].现代食品科技,2023,39(5):72-80.

MO Yunshao, ZHANG Jingfeng, AO Jialu, et al. Transcriptomic analysis of *Cronobacter sakazakii* maintaining dormancy continuum under ampicillin stress [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 72-80.

收稿日期: 2022-04-22

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目(2021A1515012416); 岭南现代农业实验室科研项目(NZ2021033)

作者简介: 莫云少(1996-), 女, 硕士, 研究方向: 食源致病菌防控, E-mail: 1461134513@qq.com; 共同第一作者: 张竞丰(1993-), 男, 博士, 研究方向: 食源致病菌防控, E-mail: 515559461@qq.com

通讯作者: 赵力超(1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食源致病菌防控, E-mail: zlc@scau.edu.cn

Key words: ampicillin; *Cronobacter sakazakii*; dormancy continuum; transcriptome

阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 是乳制品生产过程中常见的致病菌, 会导致新生儿或免疫力低下人群患严重疾病^[1]。在奶牛养殖业中, 抗生素被广泛使用。其中预防和治疗奶牛乳房炎和其他细菌性感染的抗生素主要为氨苄西林, 其容易导致乳制品生产链受到污染^[2]。因此, 氨苄西林极有可能在奶制品生产链中与阪崎克罗诺杆菌接触。团队前期试验发现阪崎克罗诺杆菌在氨苄西林胁迫下会进入连续休眠态 (Dormancy Continuum), 在胁迫去除后, 给予一定营养条件能恢复生长, 作为潜在污染源危害非常大。连续休眠态是指在环境压力胁迫的初始阶段, 会产生耐受压力的非生长细胞 (持留菌细胞), 这些细胞可以在消除压力后迅速复苏。随着胁迫时间和程度的增加, 细胞长期暴露于压力下, 休眠程度增加, 代谢活动进一步降低, 细胞需要更多时间来复苏, 这时候的细胞被称为活的非可培养状态 (Viable but Nonculturable, VBNC) 细胞^[3,4]。

代谢活性降低、运动能力减弱、细胞表面形态改变、细胞生长停滞和外排能力升高是连续休眠态的典型特征。但在不同菌种和不同逆环境中可能存在较大的调控差异。同时, 关于激活这些基因的上游调控机制仍不清晰。目前已有研究发现严谨反应和毒素-抗毒素系统 (Toxin-Antitoxin Systems, TAS) 可能在响应压力胁迫下作为分子开关启动下游调控机制, 但具体细节仍不清晰且存在争议。利用高通量转录组学分析研究细节在特殊生理状态下的调控机制, 是当前研究的热点。相比基因组和蛋白组, 转录组学更具有时空特异性, 在转录组学的分析中, 可发现更多的调控因子和更精细的调控网络。

因此, 本研究在富集获得连续休眠态菌的基础上进行转录组测序, 挖掘差异表达基因, 并利用 GO 和 KEGG 富集分析与代谢活性、细胞形态、运动能力、

细胞分裂和外排能力相关基因在连续休眠态维持中的作用, 并探究严谨反应和 TAS 对下游通路的调控机制。研究结果将为深入理解阪崎克罗诺杆菌连续休眠态的调控网络并找出维持该状态的关键基因提供理论依据, 为后续的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株、培养条件及连续休眠样品收集

阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 保藏于华南农业大学食品学院广东省功能食品活性物重点实验室。培养条件为 37 °C、200 r/min 振荡培养至对数中期 ($OD_{600\text{nm}}=0.60$)。

连续休眠态菌样品的收集。参考课题组前期建立的诱导方法, 取 1 000 mL 对数期菌液, 离心 (4 000 g, 15 min, 4 °C), 弃上清后收集菌体沉淀, 用 0.9% 氯化钠溶液洗涤 2 次并重新悬浮菌体, 使细菌的初始浓度为 10^7 CFU/mL。加入氨苄西林使其最终溶液浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$, 直至细菌丧失可培养性。

1.2 细胞计数

连续休眠态菌是指在氨苄西林作用后仍然存活的细菌。使用本课题组 Cao 等^[5]建立的方法测定细菌总菌数和活菌数, 用平板计数法测定细菌可培养数。

细菌总菌数的测定: 首先进行细菌 DNA 的提取, 取 1 mL 菌悬液, 离心 (4 000 g, 15 min, 4 °C), 去除上清, 用 1 mL 生理盐水重悬, 取其中 200 μL 菌液加入 200 μL 含 5% 质量分数的螯合树脂悬液, 涡旋 15 s 混匀后, 95 °C 水浴 10 min, 立即冷却。离心 (13 200 g, 5 min) 取上清于 -20 °C 保存备用。再进行 qPCR 的测定, 每个测定重复 3 次, 反应体系和程序如表 1。

表 1 qPCR 反应体系和程序

Table 1 qPCR reaction systems and procedures

试剂	体积/ μL
2×AceQ qPCR Probe Master Mix	12.5
上游引物 (Forward primer, 10 $\mu\text{mol/L}$)	1
下游引物 (Reverse primer, 10 $\mu\text{mol/L}$)	1
探针 (Probe, 10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
DNA 模板	5
ddH ₂ O	5
Total	25

反应程序: 预变性 95 °C、10 min, 随后 40 个循环 95 °C、15 s 和 59 °C、1 min。

细菌活菌数的测定: 在 200 μL 生理盐水重悬菌液加入 1 μL 2 mmol/L 的新型叠氮碘化丙锭 (Propidium Monoazide, PMAxx) 溶液, 使体系 PMAxx 终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。暗处理 10 min 后在 600 W 卤素灯下曝光 15 min。再加入 200 μL 含 5% 质量分数的螯合树脂悬液, 涡旋 15 s 混匀后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 立即冷却。离心 (13 200 g , 5 min) 取上清于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。qPCR 操作步骤如表 1。PMAxx-qPCR 的结果为活菌数, qPCR 的结果为总菌数。

细菌可培养数的测定: 取 1 mL 菌悬液, 离心 (4 000 g , 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 15 min), 去除上清, 用 1 mL 生理盐水重悬, 10 倍梯度稀释, 取 100 μL 各梯度稀释菌悬液均匀涂布于 LB 培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 16~24 h 后计数。

1.3 荧光显微镜观察

利用细胞凋亡检测试剂盒能在荧光显微镜下观察染色后的细胞, 确认细胞的死活状态。使用 LIVE/DEAD 试剂对待测菌液进行处理: 染料 1 (SYTO 9) 和染料 2 (PI) 等体积混合, 将 1 μL 混合染料加入到 50 μL 菌液, 吹打混匀, 避光染色 15 min。吸取 10 μL 染色后的菌液, 置于洁净的载玻片上, 盖上盖玻片。荧光显微镜 480/510 nm 激发波长, 40 \times 暗室观察形态拍照。

1.4 RNA 的提取、文库构建及测序

采用 Trizol 法对连续休眠态菌和正常菌样品进行总 RNA 提取。使用 Agilent 2100 生物分析仪验证 RNA 的完整性; 采用 NanoDrop-2000 测定 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ 和 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{230\text{nm}}$ 的吸光度比, 符合 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}} > 2.0$ 和 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{230\text{nm}} > 1.8$ 的 RNA 样本送到上海美吉生物医药科技有限公司进行构建文库和测序, 使用 Truseq RNA 样品制备试剂盒 (Truseq RNA Sample Prep Kit) 合成 cDNA。转录组测序在 Illumina HiSeqTM 2000 平台上进行。

1.5 转录组分析

所有分析均在 Majorbio I-Sanger Cloud Platform (<http://www.i-sanger.com/>) 上进行。基因表达量分析获得基因的 Read Counts 数后, 采用 DESeq2 进行样本间基因差异表达分析, 鉴定出差异表达的基因。每个样本中的基因表达水平根据基因的长度计算每百万片段中来自某一基因每千碱基长度的片段 (Fragments Per Kilobases per Millionreads, FPKM) 计算。其中 $P \leq 0.05$, $\log_2|\text{Fold Change}| \geq 1$ 的基因被认为是差异表达的基因。

1.6 逆转录实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证

为了进一步验证转录组测序数据, 选择 9 个关键基因进行 RT-qPCR 测定。按照 1.4 的方法进行 RNA 提取, 用 HiScript II Q RT SuperMix 反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA, 用于 qPCR。以 16S rRNA 作为内参基因^[6], 使用 7500 Fast Real-Time PCR System 进行 qPCR 反应, 反应程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 循环 40 次; 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析目标基因的相对表达量^[7]。

1.7 数据分析

试验数据采用 SPSS 23.0 进行显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著, 采用 Origin 2021 进行作图。

2 结果与讨论

2.1 连续休眠态菌的诱导与富集分析

基于课题组前期优化的连续休眠态细菌诱导条件, 采用 400 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄西林对阪崎克罗诺杆菌进行诱导处理, 15 d 后利用 qPCR、PMAxx-qPCR 和平板培养法分别检测总菌数、活菌数和可培养数。结果表明, 当可培养数降为 2 次方时, 活菌数仍然保留在 5 次方, 此时的大部分活菌数为连续休眠态阪崎克罗诺杆菌。

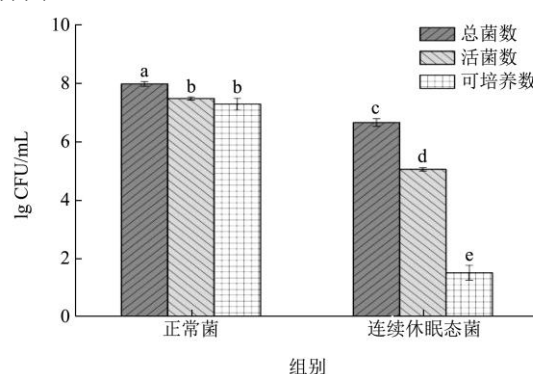


图 1 阪崎克罗诺杆菌总菌数、活菌数和可培养数测定

Fig.1 Determination of total bacterial count, viable count and culturable count of *C. sakazakii*

注: 不同小写字母代表数据具有统计学差异 ($P < 0.05$)。

对连续休眠态细菌进行富集, 并利用荧光显微镜对富集到的连续休眠态细菌进行观察。处于不同波长激发光下, 活细胞呈现绿色, 死细胞呈现红色。图 2a 为对数期的阪崎克罗诺杆菌, 全部呈绿色荧光。图 2b 为氨苄西林处理后的阪崎克罗诺杆菌, 有大部分呈现绿色, 表明富集到连续休眠态菌仍存在大量的活细胞。

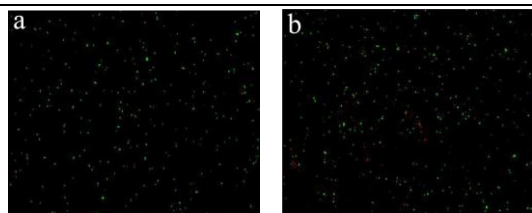


图2 荧光显微镜图(×400倍)

Fig.2 Fluorescence microscope image (×400 times)

注: (a) 正常状态阪崎克罗诺杆菌, (b) 连续休眠态阪崎克罗诺杆菌。

2.2 转录组测序数据统计分析

为了深入了解抗生素胁迫下连续休眠态细胞维持机制, 本实验对正常菌和连续休眠态菌样品进行转录组测序。测序共产生的 reads 匹配到阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 基因组 (NCBI Reference Sequence: NZ_CP011047)。由表 2 可知, 连续休眠态菌和正常菌两个组的 Q_{20} 值均大于 97%, Q_{30} 值均大于 92%。结果表明转录组测序数据质量可靠性高, 为后续的差异表达基因分析提供了科学的依据。

表 2 数据质量分析

Table 2 Quality analysis of transcriptomic sequencing data

样品	Raw Reads	Clean Reads	Q_{20} 值/%	Q_{30} 值/%
C1	44605476	44253838	97.45	92.61
C2	42231488	41916792	97.49	92.71
C3	38429920	38155712	97.52	92.77
T1	41881528	41640864	97.87	93.53
T2	47299830	46955908	97.56	92.88
T3	43251220	42871196	97.32	92.41

2.3 差异表达基因分析

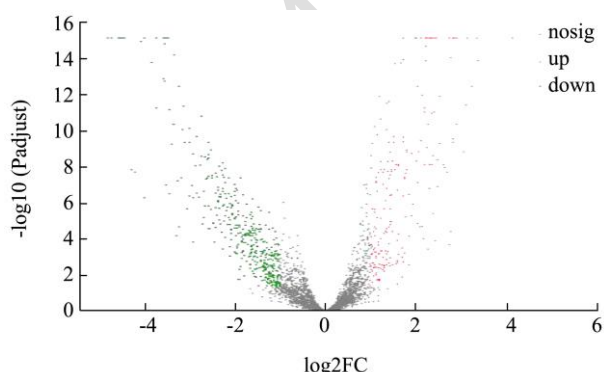


图3 连续休眠态下表达差异基因比较的火山图

Fig.3 Volcano map of differential genes of the dormancy continuum

注: 实验组和对照组的表达水平 ($P < 0.05$ 和 $|\log_2FC| > 1$)。红点表示显著上调的差异表达基因, 绿点表示显著下调的差异表达基因, 灰点表示无显著变化的其它基因。

如图 3 所示, 与正常菌相比, 连续休眠态菌的表达差异基因有 636 个, 其中表达上调的基因 220 个, 表达下调的基因 416 个。通过表达量差异火山图(图 3)可以直观地看出, 阪崎克罗诺杆菌在进入连续休眠态后, 显著下调表达的基因多于上调表达的基因数量。

2.4 GO 富集分析

对连续休眠态菌的显著差异表达基因进行 GO 注释, 共注释到 451 条显著差异表达的基因。对这些显著差异表达基因进行功能分类分析, 其中富集程度最大的前 4 条 GO 条目分别为氨基酸分解代谢过程、羧酸分解代谢过程、有机酸分解代谢过程和小分子分解代谢过程。

其中与代谢活性相关的差异表达基因主要集中在前 4 个 GO 条目中, 包括脂肪酸氧化复合亚基 FadB/FadJ、乙酰辅酶 AC-酰基转移酶 FadI、乙酰辅酶 A C-酰基转移酶 FadA 的基因表达水平均显著下调。

由于富集程度最大的前 4 个 GO Term 相关基因整体呈现下调趋势。接下来本研究重点挖掘显著上调的差异表达基因。与细胞膜合成相关基因主要被注释到 GO:0016021 条目 (膜组分), 其中膜蛋白基因 (CSK_RS21485 和 CSK_RS20150), 被膜应激响应蛋白基因 *pspB*、*pspC*、*pspG* 均显著上调。

在 GO:0009987 条目 (胞内进程) 中, 与严谨反应相关的 *relA*、*ppx*、*ppK* 基因均显著上调。而 *relA* 级联调控的 *lon* 基因也显著上调。同样在条目中, DNA 修复蛋白 *RecA*、细胞分裂抑制剂 *SulA* 的基因表达显著上调, 而 *SulA* 调控的细胞分裂蛋白 *FtsZ* 则显著下调。

另外, 在 GO:0005488 条目 (分子功能) 中, 与 TAS 相关的两个基因 (CSK_RS15575 与 CSK_RS06685) 均显著上调。为进一步挖掘阪崎克罗诺杆菌其他 TAS 相关基因的表达情况, 本研究使用 TADB 2.0 数据库, 共预测了 22 对 TAS 相关基因 (<https://db-mml.sjtu.edu.cn/TAfinder/>), 其中 3 对 TA 系统 (*toxin-6* 和 *antitoxin-6*, *toxin-13* 和 *antitoxin-13*, *toxin-18* 和 *antitoxin-18*) 以及 *toxin-15* 共 7 个基因表达均呈现明显上调, 而 2 个 II 型 TAS 调控的下游基因 *lpp* 的表达明显下调 (如表 3)。

II 型 TAS 是细菌应对压力的重要表观遗传调控机制, 由稳定的毒素蛋白和易于降解的抗毒素蛋白组成, 具有共转录和共翻译的特征。该系统能够通过干扰细胞过程如 DNA 复制、翻译、细胞分裂和 ATP 合成来抑制细胞生长。预测并分析阪崎克罗诺杆菌 TAS 中被激活的相关基因及其调控关系, 有助于解释该菌响应氨基西林维持连续休眠态的分子机制。对筛选出的 7

个 TA 基因进行深入分析, 其中 *toxin-6*、*toxin-15* 和 *toxin-18* 基因被注释为 RelE 毒素基因。Ayrapetyan 等^[8]的研究表明, RelE 毒素基因是诱导连续休眠态形成的关键。RelE 毒素的功能是在核糖体 A 位点上切割多个下游基因的 mRNA, 如靶向切割 *lpp*、*ompA* 和 *accP* 基因的 mRNA^[9,10]。本研究对阪崎克罗诺杆菌的转录组数据分析表明, 连续休眠态细胞内 *ompA* 基因的 mRNA 水平没有发生显著变化, 而 2 个 *lpp* 基因的表达显著下调, 进一步证实了阪崎克罗诺杆菌在连续休眠态形成过程中 RelE 毒素被激活。此外, *toxin-6* 和 *toxin-18* 还被注释为 ParE 毒素蛋白家族, 这种毒素蛋白抑制了 DNA 促旋酶的活性, 从而抑制 DNA 复制。

而在氨基西林诱导的连续休眠态菌中, DNA 促旋酶相关基因 (*gyrA* 和 *gyrB*) 的表达量没有显著变化, 也有报道表明 ParE 仅在 ATP 存在的情况下抑制 DNA 促旋酶^[11]。因此, 本试验推测筛选出的 *toxin-6*、*toxin-15* 和 *toxin-18* 基因主要执行 RelE 毒素功能。另一个显著表达上调的是 RES 毒素基因 *toxin-13*。RES 能通过降解 TCA 循环必需的氧化还原辅助因子 NAD⁺, 从而降低细胞的生长代谢活性, 诱导连续休眠态的形成^[12]。从 TCA 循环相关基因整体下调的趋势可以看出, RES 毒素对 NAD⁺的抑制可能是 TCA 循环途径下调的一个重要原因。

表 3 GO 富集相关基因表达情况

Table 3 GO enrichment-related gene expression

项目	基因 ID	基因名称	基因描述	FC	log ₂ FC
GO:0016021 (膜组分)	CSK_RS21485	/	膜蛋白	10.21	3.35
	CSK_RS20150	/	膜蛋白	4.89	2.29
	CSK_RS14290	<i>pspB</i>	细胞膜应激蛋白 PspB	7.01	2.81
	CSK_RS14295	<i>pspC</i>	细胞膜应激蛋白 PspC	8.65	3.11
	CSK_RS06850	<i>pspG</i>	细胞膜应激蛋白 PspG	4.77	2.25
GO:0009987 (胞内进程)	CSK_RS08765	<i>relA</i>	(p)ppGpp 合成酶	1.75	0.81
	CSK_RS09770	<i>ppx</i>	多聚磷酸酶	3.06	1.61
	CSK_RS09775	<i>ppk</i>	外切多聚磷酸酶	2.10	1.07
	CSK_RS18170	<i>lon</i>	Lon 蛋白酶	3.88	1.96
	CSK_RS08980	<i>recA</i>	重组酶	4.05	2.01
	CSK_RS18155	<i>sulA</i>	细胞分裂抑制剂	10.32	3.37
	CSK_RS00880	<i>ftsZ</i>	细胞分裂蛋白 FtsZ	0.40	-1.32
	CSK_RS15575	<i>antitoxin-18</i>	XRE 家族抗毒素蛋白	1.97	0.98
	CSK_RS06685	<i>antitoxin-6</i>	XRE 家族转录调节因子	2.37	1.24
	CSK_RS06680	<i>toxin-6</i>	RelE/ParE 家族毒素蛋白	2.20	1.14
GO:0005488 (分子功能)	CSK_RS11005	<i>toxin-13</i>	RES 结构域蛋白	4.07	2.03
	CSK_RS11010	<i>antitoxin-13</i>	假设蛋白 XRE	4.81	2.27
	CSK_RS12170	<i>toxin-15</i>	RelE 毒素蛋白	1.95	0.96
	CSK_RS15580	<i>toxin-18</i>	RelE/ParE 毒素蛋白	1.98	0.99
	CSK_RS17830	<i>lpp</i>	脂蛋白	0.19	-2.36
	CSK_RS16615	<i>lpp</i>	主要外膜脂蛋白	0.02	-5.41

注: “/”代表未知基因名称。

氨基西林激活 TAS 从而调控连续休眠细胞的形成。多项研究表明, 严谨反应是调控 TAS 的上游分子机制。在本研究中, (p)ppGpp 合成酶基因 *relA* 显著上调, 表明该基因在连续休眠态形成过程中负责 (p)ppGpp 的积累。一项研究报告表明 *relA* 在连续休眠态的霍乱弧菌中被上调^[13], 与本研究的结论相一致。也有研究表明压力胁迫会激活 *spoT*, 只是表达水平相对较低^[14]。此外, 连续休眠态的阪崎克罗诺杆菌 *ppx*

基因显著上调。已报道 *ppx*/鸟苷五磷酸水解酶(GPPA)同时具有胞外磷酸酶和把鸟苷五磷酸 (pppGpp) 水解产生鸟苷四磷酸 (ppGpp) 的磷酸水解酶活性。基因 *relA* 和 *ppx* 的上调表明抗生素胁迫下促进了 ppGpp 的合成。ppGpp 的积累可以激活多聚磷酸激酶 (PPK), 导致多聚磷酸盐 (PolyP) 的积累。在本研究中, *ppk* 的表达显著上调。类似地, 在 Gangaiah 等^[15]的研究中, *ppk* 在连续休眠态的形成和 PolyP 的积累发挥了重要

作用。PolyP 的积累激活 Lon 蛋白酶, 通过降解抗毒素触发 TAS 的活性, 从而释放毒素诱导连续休眠细胞。在本研究中, *lon* 的表达显著上调。因此, 本研究推测, 严谨应答是 TAS 调控连续休眠细胞形成的上游分子开关, 其调控机制如图 5 所示。阪崎克罗诺杆菌在进入连续休眠态过程中, 严谨应答的关键基因 *relA* 上调, 协同 *ppx/GPPA* 调控信号分子(p)ppGpp 的生成, 后者调控多聚磷酸激酶基因 *ppk* 表达, 导致 PolyP 的积累。PolyP 进一步激活抗毒素降解酶基因 *lon* 表达上调, 从而激活 TAS, 诱导连续休眠态形成。

在形成连续休眠态后, 细菌可能通过改变细胞形态, 抑制细胞分裂来维持。多项研究表明, 处于连续休眠态下, 细菌细胞壁结构增强, 在保持细胞完整性的同时表现出矮化或形成杆状、短杆状的形态, 有利于耐受更高的物理、化学和抗生素抗性, 保护细胞免受外界损害^[16-18]。在本研究中, 与肽聚糖合成、膜蛋白相关基因的上调, 对于增厚细胞壁, 改变细胞外膜形态, 具有重要作用。因此, 在氨苄西林胁迫下, 阪崎克罗诺杆菌可能通过改变细胞表面形态来维持连续休眠态。

细胞分裂也是连续休眠态菌的一个主要特征。细菌胞质分裂中最早的事件是 FtsZ 定位到未来的分裂位点, 并联合其他辅助蛋白(如 ZipA、ZapA)组装成 Z 环。环的收缩产生两个相等的子细胞^[19]。在本研究结果中, 尽管辅助蛋白 ZipA 变化不显著, 但 *ftsZ* 基因与另一辅助蛋白基因 *zapA* 被显著下调。ZapA 主要通过抑制 FtsZ GTPase 活性来激活细胞分裂, 从而促进 FtsZ 组装成形成分裂 Z 环。此外, *ftsZ* 的抑制剂基因 *sulA* 被显著上调。SulA 能够抑制 FtsZ 聚合, 并

阻止其参与 Z 环的组装。*sulA* 的转录表达是细菌 DNA 损伤修复机制(SOS 途径)中的一个关键因子, 受到 RecA 蛋白的转录调控^[20,21]。*recA* 与 *sulA* 同时上调, 表明细菌在连续休眠态下启动了 DNA 损伤修复机制。因此, 氨苄西林胁迫可能也导致了 DNA 损伤, 细菌通过 RecA 转录调控 SulA 蛋白, 后者通过抑制 FtsZ 蛋白, 从而抑制了细胞分裂。

2.5 KEGG 富集分析

为了进一步研究氨苄西林诱导的生物学通路, 将前面筛选到的 636 个差异表达基因匹配到 KEGG 数据库内的相关通路(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)。结果显示, 前 3 条最显著的 KEGG 通路分别是 TCA 循环途径、脂肪酸降解途径和鞭毛组装途径, 共有 30 个差异显著表达基因分布在这些 KEGG 途径中。如表 4 所示, 在连续休眠态阪崎克罗诺杆菌细胞中, 与代谢活性相关的差异表达基因主要被注释到 TCA 循环和脂肪酸降解途径(map 00020 和 map 00071)中, 且与富集程度最大的前 4 个 GO 条目中差异表达基因大量重合。其中 TCA 循环中 3 个关键酶 SucA、GltA 和 IDH1 的基因表达水平显著下调, 编码脂肪酸降解途径相关酶的基因 *fadA*、*fadB*、*fadJ* 和 *fadE* 也显著下调; 与运动能力相关的差异表达基因主要被注释到鞭毛组装途径(map 02040)中, *flgM*、*flgN*、*motA* 和 *motB* 基因表达显著下调; 与药物外排能力相关的差异表达基因主要被注释到内酰胺抗性途径(map 01501)中, 其中外排泵系统相关基因 *acrA* 和 *tolC* 显著上调。

表 4 TCA 循环、脂肪酸降解和鞭毛组装相关基因

Table 4 Genes involved in TCA cycle and fatty acid degradation pathway

项目	基因 ID	基因名称	基因描述	FC	log ₂ FC
TCA 循环 (map 00020)	CSK_RS19240	<i>sucA</i>	2-酮戊二酸脱氢酶 E1 成分	0.23	-2.13
	CSK_RS19265	<i>gltA</i>	柠檬酸合酶	0.19	-2.42
	CSK_RS23235	<i>idh1</i>	异柠檬酸脱氢酶 (NADP ⁺)	0.44	-1.20
脂肪酸降解 (map 00071)	CSK_RS03330	<i>fadA</i>	乙酰辅酶 A C-酰基转移酶 FadA	0.17	-2.58
	CSK_RS03325	<i>fadB</i>	脂肪酸氧化复合物 α 亚基 FadB	0.11	-3.24
	CSK_RS10865	<i>fadJ</i>	脂肪酸氧化复合物 α 亚基 FadJ	0.24	-2.08
	CSK_RS00250	<i>fadE</i>	酰基辅酶 A 脱氢酶	0.17	-2.57
鞭毛组装 (map 02040)	CSK_RS17790	<i>flgM</i>	抗 sigma-28 因子 FlgM	0.42	-1.26
	CSK_RS17795	<i>flgN</i>	鞭毛伴侣蛋白 FlgN	0.39	-1.37
	CSK_RS13085	<i>motA</i>	鞭毛马达旋转蛋白 MotA	0.19	-2.41
	CSK_RS13090	<i>motB</i>	运动蛋白 MotB	0.32	-1.64
内酰胺抗性途径 (map 01501)	CSK_RS20125	<i>acrA</i>	多药外排泵 AcrA	2.17	1.12
	CSK_RS08105	<i>tolC</i>	外膜通道蛋白 TolC	2.08	1.06

细菌还可能通过降低代谢活性、减弱运动能力,同时增强药物外排能力,来维持连续休眠态。与代谢活性相关的差异表达基因主要集中在 TCA 循环途径和脂肪酸降解途径,且多个显著富集的 GO 条目中的差异表达基因均被注释到该通路。TCA 循环被报道是连续休眠态细胞形成的关键通路,也是维持该状态细菌低代谢活性的关键^[22]。TCA 循环基因的表达量整体也呈现下调的趋势。Crabbé 等^[23]报道 TCA 途径通过减少电子供体 NADH 和 FADH₂、降低质子动力势 (PMF) 来重塑细菌代谢进程,从而使细菌在抗生素处理下存活。另外, Liu 等^[24]鉴定了氨苄西林的结合蛋白 ETAE_3367 (GorA),该蛋白能够与 TCA 循环中的 *sucA* 发生相互作用。因此,除了 TAS 的调控作用,氨苄西林也可能通过调控 *sucA*,从而影响整个 TCA 循环途径,进而维持连续休眠态。另一个与代谢活性相关的显著富集通路是脂肪酸降解。该途径产生的 Acetyl-Cov 是控制 TCA 循环启动的关键因子,从而间接调控连续休眠态菌的代谢活性。在连续休眠态阪崎克罗诺杆菌细胞中,编码脂肪酸降解途径相关酶的基因 (*fadE*、*fadB*、*fadJ* 和 *fadA*) 表达显著下调,减弱了细胞对脂肪酸的 β -氧化,TCA 循环的反应底物乙酰辅酶 A 浓度降低。因此,结合 TCA 循环途径的下调,氨苄西林胁迫下阪崎克罗诺杆菌可能通过下调脂肪酸降解途径,减少了 TCA 循环的前体物质,从而影响了连续休眠态菌的代谢活性。

运动能力受损是连续休眠状态菌的一个重要特征,主要受鞭毛途径的影响。细菌可以利用鞭毛来控制自身避开逆环境,趋向有利环境。鞭毛基部蛋白包括合成 C 环的 FliG、FliM 和 FliN,以及形成质子通道的 MotA 和 MotB。编码 C 环的基因表达水平均无显著变化。而 *motA* 和 *motB* 基因表达显著下调,编码 MotA 和 MotB 作为 H⁺驱动的鞭毛基部质子通道蛋白也可能受到抑制,无法产生足够的电势,以及鞭毛转矩所需要的机械功。同时,编码鞭毛丝组装的 *fliC* 基因也显著下调,表明连续休眠态菌的黏附能力可能受损,降低了细菌的趋化反应,运动能力下降。

在这项研究中,与药物外排能力相关的差异表达基因主要被注释到内酰胺抗性途径中。其中多重药物外排基因 *tolC* 是许多细菌外排泵的核心成分,可以与特异性内膜复合物结合,组成抗生素主动外排泵,且底物具有广谱性^[25,26]。能与 TolC 蛋白形成抗生素主动外排泵的 AcrA、MacA、MacB、EmrB、EmrA 蛋白对应的基因与 *tolC* 的表达趋势相同。这 6 个外排基因在连续休眠态菌中显著上调,说明当阪崎克罗诺杆菌

进入连续休眠态后,抗生素多药外排泵使其对抗生素耐受性增强。

2.6 RT-qPCR 验证分析

对选取的 9 个关键基因进行 RT-qPCR 验证,如图 4 所示,RT-qPCR 结果与转录组结果具有一致性。因此,充分验证了转录组数据的正确性与可靠性。

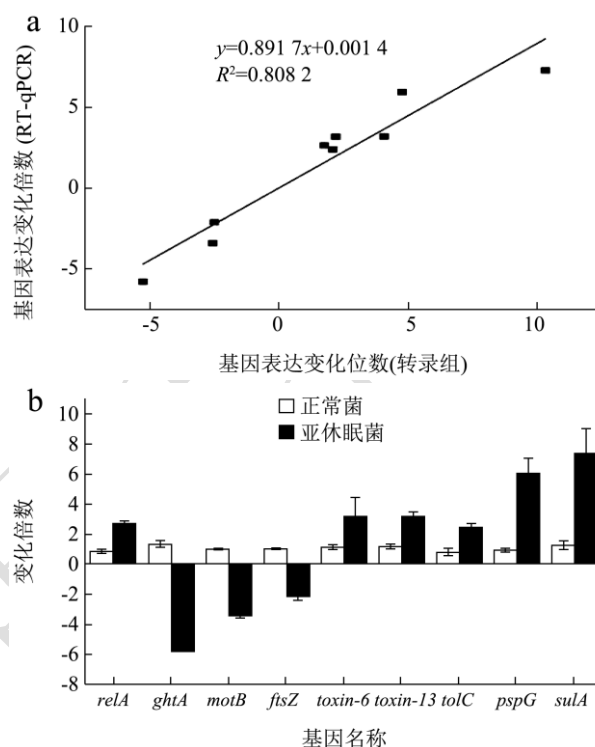


图 4 RT-qPCR 验证

Fig.4 RT-qPCR validations

注: (a) 转录组和 qPCR 的一致性验证, (b) RT-qPCR 检测关键基因表达量。

3 结论

本研究以氨苄西林诱导形成的连续休眠态阪崎克罗诺杆菌为研究对象,利用转录组测序手段研究连续休眠态维持的分子机制,筛选出差异表达基因,其中显著上调基因 220 个,显著下调基因 416 个。对筛选出的差异表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,结果表明氨苄西林胁迫下阪崎克罗诺杆菌启动严谨反应,通过 *relA*/GppA、*ppk*、*lon* 级联激活 TAS,从而诱导连续休眠态形成。在 TAS 中共筛选到 7 个显著上调的 TAS 基因,分别注释到 RelE、RES 和 ParE 家族。RelE 可能通过靶向作用于 *lpp* 等 mRNA 来促使细胞生长停滞。RES 毒素可能抑制 NAD⁺,从而下调 TCA 循环,降低细胞生长代谢活性。在进入连续休眠态后,阪崎克罗诺杆菌可能通过降低代谢活性和细胞的运动性,抑制细胞分裂相关基因,并改变细胞形态,增强药物

外排能力,从而维持连续休眠态。针对阪崎克罗诺杆菌连续休眠态的维持机制筛选天然活性抑菌物,或改

进杀菌工艺,对于控制奶粉中的阪崎克罗诺杆菌具有重要的理论价值。

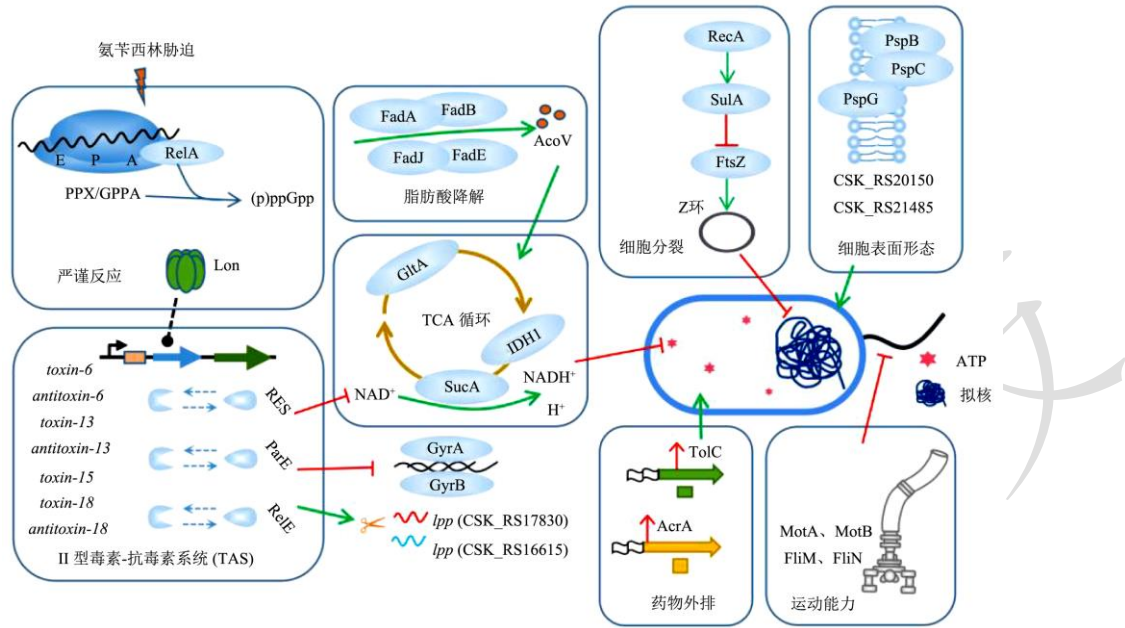


图5 氨苄西林胁迫下阪崎克罗诺杆菌维持连续休眠态的潜在分子机制

Fig.5 The potential molecular maintenance mechanism of the dormancy continuum of *C. sakazakii* under ampicillin stress

参考文献

[1] Feeney A, Kropp K A, O'Connor R, et al. *Cronobacter sakazakii*: stress survival and virulence potential in an opportunistic foodborne pathogen [J]. Gut Microbes, 2014, 5(6): 711-718.

[2] Cl áudia, Elizabeth, Volpe, et al. Fatal *Cronobacter sakazakii* sequence type 494 meningitis in a newborn, Brazil [J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(10): 1948-1950.

[3] Oliver J D. The viable but nonculturable state in bacteria [J]. Journal of Microbiology, 2005, 43: 93-100.

[4] Ayrapetyan M, Williams T C, Oliver J D. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria [J]. Trends in Microbiology, 2015, 23(1): 7-13.

[5] Cao X, Zhao L, Zhang J, et al. Detection of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp samples using improved real-time PCR and real-time LAMP methods [J]. Food Control, 2019, 103: 145-152.

[6] Kim S, Hwang H, Kim K P, et al. Hfq plays important roles in virulence and stress adaptation in *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 [J]. Infection & Immunity, 2015, 83(5): 2089-2098.

[7] Livak K J, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCt method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[8] Ayrapetyan M, Williams T C, Baxter R, et al. Viable but nonculturable and persister cells coexist stochastically and are induced by human serum [J]. Infection and Immunity, 2015, 83(11): 4194-4203.

[9] Pedersen K, Zavialov A V, Pavlov M Y, et al. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site [J]. Cell, 2003, 112(1): 131-140.

[10] Ralph B, Schuster C F. Post-transcriptional regulation of gene expression in bacterial pathogens by toxin-antitoxin systems [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2014, 4: 6.

[11] Srivastava A, Pati S, Kaushik H, et al. Toxin-antitoxin systems and their medical applications: current status and future perspective [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(5): 1803-1821.

[12] Skjerning R B, Senissar M, Winther K S, et al. The RES domain toxins of RES-Xre toxin-antitoxin modules induce cell stasis by degrading NAD⁺ [J]. Molecular Microbiology, 2018, 111(1): 221-236.

[13] Mishra A, Taneja N, Sharma M. Viability kinetics, induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in freshwater microcosm [J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(5): 945-953.

[14] Nowakowska J, Oliver J D. Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable

- state [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 84(1): 213-222.
- [15] Gangaiah D, Kassem I I, Liu Z, et al. Importance of polyphosphate kinase 1 for *Campylobacter jejuni* viable-but-nonculturable cell formation, natural transformation, and antimicrobial resistance [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(24): 7838-7849.
- [16] Zhao X, Zhong J, Wei C, et al. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 580.
- [17] 谷立慧,钟青萍,方祥,等.“活的非可培养态”食源致病细菌的研究进展[J].食品与发酵工业,2016,42(2):270.
- [18] Zhao F, Bi X, Hao Y, et al. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 by high pressure CO₂ and its characteristics [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62388.
- [19] Goehring N W, Beckwith J. Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery [J]. Current Biology, 2005, 15(13): R514-R526.
- [20] Schoemaker J M, Gayda R C, Markovitz A. Regulation of cell division in *Escherichia coli*: SOS induction and cellular location of the sulA protein, a key to lon-associated filamentation and death [J]. Journal of Bacteriology, 1984, 158(2): 551-561.
- [21] Del Val E, Nasser W, Abaibou H, et al. Design and comparative characterization of RecA variants [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 1-17.
- [22] Thandavarayan R, Amit G, Pazhani G P, et al. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria [J]. Frontiers in Public Health, 2014, 2: 103.
- [23] Crabbé A, Jensen P S, Bjarnsholt T, et al. Antimicrobial tolerance and metabolic adaptations in microbial biofilms [J]. Trends in Microbiology, 2019, 27(10): 850-863.
- [24] Liu X, Zhu W, Su Y, et al. Characterization of ampicillin-stressed proteomics and development of a direct method for detecting drug-binding proteins in *Edwardsiella tarda* [J]. Journal of Proteomics, 2015, 116: 97-105.
- [25] 侯博.TolC 在肠外致病性大肠杆菌中的生物学功能研究 [D].武汉:华中农业大学预防兽医学,2014.
- [26] Pu Y, Zhao Z, Li Y et al. Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells [J]. Molecules Cell, 2016, 62(2): 284-294.