

研究报告



基于转录组学与蛋白质组学对猪丹毒丝菌耐药性的研究

唐正露[△] 朱艳艳[△] 李琳 李亮 刘雪兰 孙裴 李郁*

安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036

摘要:【背景】β-内酰胺类(β-Lactams)抗生素是防治猪丹毒的常用药物,其中青霉素(Penicillin, PG)更是首选药物。【目的】运用转录组学与蛋白质组学方法初步探究猪丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*, *E. rhusiopathiae*)产生 PG 抗性的机制,为进一步开展 *E. rhusiopathiae* 耐药机制的研究奠定基础。【方法】采用 K-B 纸片法和微量稀释法分别测定受试菌株 AEr51、AEr31 和 AErS 对 26 种抗生素的感受性及对 PG、阿莫西林(AMX)和氨苄西林(AMP)的最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC);然后通过转录组学测序(RNA-Seq)技术和串联质谱标签法(Tandem Mass Tag, TMT)定量蛋白质组学技术进一步探究猪丹毒丝菌产生 PG 抗性的分子机制。【结果】AEr51、AEr31 和 AErS 对 26 种抗生素耐药率分别为 34.62%、26.92%和 34.62%,其中 AErS 和 AEr31 对所有 β-Lactams 抗生素敏感,而 AEr51 除对 PG 耐药外,对其他 β-Lactams 抗生素均敏感;AEr51、AEr31 和 AErS 对 PG、AMX、AMP 的 MIC 分别为 32、4、2 μg/mL, 0.25、0.50、0.50 μg/mL 和 0.125、0.500、0.250 μg/mL; RNA-Seq 分析显示 AEr51/AErS 比较组中共筛到 668 个差异基因,其中上调 434 个、下调 234 个, AEr51/AEr31 比较组中共筛到 403 个差异基因,其中上调 275 个、下调 128 个,差异表达基因主要富集于代谢途径、ABC 转运系统、β-内酰胺抗性、双组分信号传导系统等通路,而且与 RT-qPCR 验证结果基本一致;TMT 分析显示 AEr51/AErS 比较组中共筛到 167 个差异蛋白,其中上调 86 个、下调 81 个, AEr51/AEr31 比较组中共筛到 159 个差异蛋白,其中上调 80 个、下调 79 个,差异表达蛋白显著富集于微生物、氨基酸、碳、硫、嘧啶代谢等相关的代谢通路,而且与平行反应监视(Parallel Reaction Monitoring, PRM)靶向验证结果基本一致。【结论】ABC 转运系统、双组分信号传导系统、β-内酰胺抗性等通路在猪丹毒丝菌对青霉素耐药性产生过程中发挥重要作用,同时伴随微生物、氨基酸、碳、硫、嘧啶代谢等生命过程。

关键词: 猪丹毒丝菌, 青霉素, 耐药性, 转录组学, 蛋白质组学

Foundation items: Key Project of National Spark Program of China (2014GA710002); Key Research and Development Program of Anhui Province (201904a06020013); Science and Technology Project of Triangle Joint in Anhui Province (1101c0603065); Pig Industry System Fund of Anhui Province ([2016]84)

[△]These authors equally contributed to this work

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

Received: 12-01-2021; **Accepted:** 10-02-2021; **Published online:** 09-04-2021

基金项目: 国家星火计划重点项目(2014GA710002);安徽省重点研究与开发计划(面上攻关)项目(201904a06020013);安徽省长三角联合科技攻关项目(1101c0603065);安徽省生猪产业体系基金(皖农科[2016]84号)

[△]对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: liyouer@163.com

收稿日期: 2021-01-12; 接受日期: 2021-02-10; 网络首发日期: 2021-04-09

Study on the resistance of *Erysipelothrix rhusiopathiae* based on transcriptomics and proteomics

TANG Zhenglu[△] ZHU Yanyan[△] LI Lin LI Liang LIU Xuelan SUN Pei LI Yu^{*}

College of Animal Science and Technology, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036, China

Abstract: **[Background]** β -lactam antibiotics are commonly used drugs for the prevention and treatment of swine erysipelas, and penicillin (PG) is the preferred drug. **[Objective]** The use of transcriptomics and proteomics methods to preliminarily explore the mechanism of *Erysipelothrix rhusiopathiae* (*E. rhusiopathiae*) producing penicillin resistance, laying a foundation for further research on the resistance mechanism of *E. rhusiopathiae*. **[Methods]** The susceptibility to 26 antibiotics and the minimum inhibitory concentration (MIC) to PG, amoxicillin (AMX) and ampicillin (AMP) of the tested strains AErS, AEr51 and AEr31 were determined by the Kirby-Bauer disk diffusion method and the microdilution method; Then through transcriptomics sequencing (RNA-Seq) technology and tandem mass tag (TMT) quantitative proteomics technology to further explore the molecular mechanism of *E. rhusiopathiae* producing penicillin resistance. **[Results]** The resistance rates of AErS, AEr51 and AEr31 to 26 antibiotics were 34.62%, 34.62%, and 26.92%, respectively. AErS and AEr31 were sensitive to all β -lactams antibiotics, while AEr51 was sensitive to other β -lactams antibiotics except PG; the MICs of AErS, AEr51 and AEr31 to PG, AMX and AMP were 0.125, 0.500, 0.250 $\mu\text{g/mL}$, 32, 4, 2 $\mu\text{g/mL}$ and 0.25, 0.50, 0.50 $\mu\text{g/mL}$, respectively; RNA-Seq analysis showed a total of 668 differential genes were screened in the AEr51/AErS comparison group, of which 434 were up-regulated and 234 were down-regulated. In the AEr51/AEr31 comparison group, a total of 403 differential genes were screened, of which 275 were up-regulated and 128 were down-regulated. The differentially expressed genes were mainly enriched in the metabolic pathway, ABC transport system, two-component signal transduction system, β -lactam resistance and other pathways, and the results of RT-qPCR verification were basically the same; TMT analysis showed that a total of 167 differential proteins were screened in the AEr51/AErS comparison group, among which 86 were up-regulated and 81 were down-regulated. A total of 159 differential proteins were screened in the AEr51/AEr31 comparison group, of which 80 were up-regulated and 79 were down-regulated. Differentially expressed proteins were significantly enriched in metabolic pathways related to microorganisms, amino acids, carbon, sulfur, and pyrimidine metabolism, and the results of PRM targeting verification were basically the same **[Conclusion]** ABC transport system, two-component signal transduction system, β -lactam resistance and other pathways played an important role in the development of *E. rhusiopathiae* resistance to PG, and were accompanied by life processes, such as microorganisms, amino acid, carbon, sulfur, and pyrimidine metabolism, etc.

Keywords: *E. rhusiopathiae*, penicillin, drug resistance, transcriptomics, proteomics

猪丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*, *E. rhusiopathiae*) 又称猪红斑丹毒丝菌或猪丹毒杆菌, 是一种重要的人畜共患病原菌, 可引起猪丹毒和人类丹毒等, 临床表现为急性败血症型、亚急性疹块型和慢性心内膜炎型^[1]。猪丹毒呈世界性分布, 主要通过消化道进行传播, 病猪和带菌猪是该病主要的传染源, 当受外界因素影响造成猪群免疫力降低或细菌毒力增强时, 常引起暴发性流行^[2]。

尽管数十年来, 通过疫苗普遍免疫接种和抗生素治疗使得该病得到有效的全面控制, 但随着近年来大多数养殖场对疫苗接种的忽视和抗菌药物的过度使用, 猪丹毒正呈卷土重来之势, 一旦暴发将对养猪生产和人类健康造成巨大威胁^[3-4]。

β -内酰胺类 (β -Lactams) 抗生素指化学结构中具有 β -内酰胺环的一大类杀菌药物, 包括临床最常用的青霉素 (PG) 与氨苄西林 (AMP), 具有抗菌

谱广、杀菌活性强及良好的药代动力学性能,能够抑制细菌细胞壁的合成,是治疗革兰氏阳性细菌病的首选^[5]。然而,由于长期不合理的使用,*E. rhusiopathiae*对 β -Lactams的抵抗力增强,已出现了对PG、AMX等 β -Lactams抗生素耐受的临床分离菌株。革兰氏阳性菌对 β -Lactams的耐药机制复杂,包括产生 β -Lactams酶、药物作用靶点的改变和外排泵等^[6-8]。然而目前关于*E. rhusiopathiae*抵抗PG耐药机制的研究鲜少报道。转录组学和蛋白质组学同属于多组学研究,是当今生命科学研究领域不可或缺的有力工具,通过高通量测序技术获得细菌全基因组信息以及与耐药相关的基因、功能和某些调控途径,同时通过蛋白质组学技术对耐药蛋白进行定性及定量分析,2种方法的结合有助于更全面地阐明细菌的耐药机制^[9-10]。本实验室在前期的猪细菌病流行病学调查中获得了一株对PG产生抗性的*E. rhusiopathiae*(代号AEr51),本研究以此为研究对象,运用转录组学测序(RNA-Seq)技术和串联质谱标签法(Tandem Mass Tag, TMT)定量蛋白质组学技术初步探究*E. rhusiopathiae*产生PG抗性的分子机制,以期为进一步开展*E. rhusiopathiae*耐药机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

*E. rhusiopathiae*受试菌株AEr51(PG抗性)、参考菌株AEr31(PG敏感)均源自安徽农业大学动物传染病实验室开展的安徽、江苏、山东、河北、广西部分地区的猪细菌病流行病学调查;*E. rhusiopathiae*标准株ATCC19414(AErS)购自广东省菌株保藏中心;大肠杆菌标准株ATCC25922购自中国药品生物制品检定所。

1.2 主要试剂、仪器及培养基

50 \times TAE,生工生物工程(上海)股份有限公司;DL2000 DNA Marker、Premix TaqTM、Loading Buffer、PrimeScript RT Reagent Kit、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II,宝生物工程(大连)有限公司。青霉素

(PG)、氨苄西林(AMP)、阿莫西林(AMX)、头孢氨苄(CA)、头孢唑啉(CFZ)、头孢拉定(CH)、头孢曲松(CTR)、头孢呋辛(CFX)、头孢噻肟(CTX)、头孢噻肟(Cef)、四环素(TE)、多西环素(DX)、庆大霉素(GEN)、链霉素(STR)、卡那霉素(RAN)、新霉素(NEO)、大观霉素(SPT)、氟苯尼考(FFC)、红霉素(ERY)、林可霉素(Lin)、甲氧苄胺嘧啶(TMP)、复方新诺明(SXT)、替米考星(Tim)、恩诺沙星(ENR)、环丙沙星(CIP)、磺胺间甲氧嘧啶钠(Sul)药敏纸片,绍兴天恒生物科技有限公司;98.8% PG,中国药品生物制品检定所;85.8% AMX、98.0% AMP,中国兽医药品监察所。

PCR仪,杭州晶格科学仪器有限公司;电泳仪,北京市六一生物技术有限公司;恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;高速冷冻离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂。

MH肉汤培养基、BHI培养基、营养琼脂培养基,杭州微生物试剂有限公司。

1.3 药物感受性测定

以大肠杆菌ATCC25922、猪丹毒丝菌ATCC19414为质控菌株,采用WTO推荐的K-B纸片法测定AEr51、AEr31和AErS对26种抗生素的耐受性,按美国临床与实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) M100-S21判定结果。

1.4 最小抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)的测定

以*E. rhusiopathiae* ATCC19414为质控菌株,参照CLSI抗菌药物敏感性试验操作标准,采用微量稀释法测定AEr51、AEr31和AErS对PG、AMX和AMP的MIC,试验平行3次,取平均值。

1.5 RNA-Seq分析及荧光定量验证

1.5.1 *E. rhusiopathiae* AEr51、AEr31和AErS样品制备

将AEr51、AEr31和AErS分别划线接种于含

5%血清的 TSA 固体培养基, 37 °C 培养 16 h, 挑取单菌落转接于含 5%血清的 TSB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 培养过夜; 以 1:100 的比例转接至 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养至对数生长期(OD_{600} 约为 0.4), 将菌液于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, PBS 洗涤沉淀, 重复 3 次, 置于液氮中速冻, 收集菌体进行转录组测序。

1.5.2 转录组测序及差异基因 GO 和 KEGG 富集分析

使用 HiSeq 测序平台对 AEr51、AEr31 和 AErS 进行转录组测序, 主要步骤包括: 通过 RNA 提取试剂盒抽提细菌 RNA, 检测其纯度、浓度及完整性, 合格后进行纯化和片段化处理并合成双链 cDNA。之后对双链 cDNA 进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 用 AMPure XP Beads 选择片段大小。PCR 扩增后, 再用 AMPure XP Beads 纯化 PCR 产物, 最终得到 cDNA 文库, 使用 HiSeq 测序平台对构建的文库测序。采用 HTSeq 软件对各样品进行基因表达水平分析, 比对结果使用 FPKM (Fragments per Kilobase of Exon per Million Fragments Mapped) 法进行计算, $|\text{Log}_2(\text{Fold Change})| > 1$ 且 $P < 0.005$ 为差异阈值筛选差异表达基因。分别将筛选到的差异表达基因导入 GO 数据库和 KEGG 数据库, 以确定差异表达基因所行使的主要生物学功能和参与的主要代谢通路。

1.5.3 差异表达基因验证

按 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 荧光定量试剂盒说明书, 以 16S rRNA 为内参基因, 用 RT-qPCR 对转录组测序中部分差异表达基因进行表达水平的相对定量检测。根据 NCBI 公布的 *E. rhusiopathiae* 的基因组序列设计引物, 引物信息见表 1。通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算目的基因 mRNA 的转录水平, 以 16S rRNA 内参基因作为参照, 计算选定的差异表达基因的相对表达量。公式为: $\Delta\Delta C_T = [C_{T(\text{目的基因, 待测组})} - C_{T(\text{内参基因, 待测组})}] - [C_{T(\text{目的基因, 对照组})} - C_{T(\text{内参基因, 对照组})}]$ 。

1.6 TMT 定量蛋白质组学及平行反应监视 (Parallel Reaction Monitoring, PRM) 靶向蛋白验证

1.6.1 菌体蛋白提取和定量

分别挑取 AEr51、AEr31 和 AErS 的单菌落, 接种于含 5%胎牛血清的 TSB 培养基中, 37 °C、150 r/min 振荡培养 18–24 h (OD_{600} 约为 0.4), 将菌液于 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 得到菌体沉淀, 0.01 mol/L PBS 洗涤沉淀并重复上述离心步骤 2 次。加入 300 μ L 裂解缓冲液 (8 mol/L 尿素、1% 蛋白酶抑制剂和 2 mmol/L EDTA) 重悬沉淀后, 冰水浴超声 (60 Hz, 工作 3 s, 间隔 3 s) 破碎 5 min 提取菌体蛋白, 按 BCA 试剂盒说明测定蛋白浓度, 再取 30 μ g 蛋白加入 5 \times 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 进行 12% SDS-PAGE 电泳检测蛋白质量。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer information for qPCR

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	产物长度 Products length (bp)
16S rRNA	F: GAAGCAACGCGAAGAACCTT R: CCCAACATCTCACGACACGA	122
ERH_0226	F: CGGAACGTTTCTCGCAGTAG R: CTGTTTAACGCGCCCTTATCC	168
ERH_1052	F: TGAATGGCTTGAGGGCTATCT R: ACGACCACATTACAAACACGG	96
ERH_0095	F: AGACCGTGGTCTCGTCAAT R: GATAAATGCGGTCTCTCCC	115
ERH_0186	F: CACCGAAGTCATTGCGCTAC R: TCATCAGTACCCGCTGTTCC	163
ERH_0199	F: CGTAAGACGCCGAAAGATGAG R: CGTTGACGTTACACCACAGA	116
ERH_0082	F: GTTCTTGTACCTGGAAGCAGTATG R: GTTATTCTGCGATCTTTCTCGTC	99

1.6.2 样品酶解与 TMT 标记

在蛋白溶液中加入适量二硫苏糖醇,使终浓度为 5 mmol/L, 56 °C 作用 30 min, 再加碘代乙酰胺使终浓度为 11 mmol/L, 室温下避光孵育 15 min。最后稀释样品尿素浓度为 <2 mol/L。按胰酶:蛋白体积比为 1:50 加入胰酶, 37 °C 过夜。再以 1:100 加入胰酶, 继续酶解 4 h。酶解肽段经 Strata X C18 除盐后进行真空冷冻干燥, 用 0.5 mol/L 四乙基溴化铵(Triethylammonium Bicarbonate, TEAB)溶解肽段, 利用 TMT 试剂盒对肽段进行标记。利用高 pH 反向 HPLC 对肽段进行分级, 色谱柱为 Agilent 300 Extend C18 (粒径 5 μm, 内径 4.6 mm, 长 250 mm)。

1.6.3 液相色谱-质谱联用及差异蛋白生物信息学分析

利用液相色谱流动相 A 相(0.1%体积分数的甲酸水溶液)将 1.6.2 中肽段溶解, 后经 EASY-nLC 1000 超高效液相系统分离, 流动相 A 为水溶液(含 0.1%甲酸); 流动相 B 为乙腈溶液(含 0.1%甲酸)。液相梯度设置为 0–40 min, 6%–20% B; 40–52 min, 20%–30% B; 52–56 min, 30%–80% B; 56–60 min, 80% B, 流速维持在 350 nL/min。被分离组分进入 NSI 离子源中电离, 然后进行 Orbitrap Fusion Lumos 质谱分析。离子化后依次进行一级、二级质谱分析, 获得质谱原始数据。利用 MaxQuant (V1.5.2.8)数据库对二级质谱数据进行检索。检索参数设置参考李琳等^[11]。

对蛋白质组学数据进行分析, 以 2 倍为变化阈值(Fold Change ≥ 2 或 ≤ 0.5), $P < 0.05$ 为标准, 对差异蛋白进行蛋白注释、蛋白质功能富集和基于蛋白功能富集的聚类分析等生物信息学分析。

1.6.4 PRM 靶向蛋白验证

样品经酶解后采用液相色谱-质谱联用技术进行 PRM 靶向蛋白验证, 操作同 1.6.3。液相梯度调整为 0–38 min, 7%–25% B; 38–52 min, 23%–40% B; 52–56 min, 40%–80% B; 56–60 min, 80% B, 流速维持在 700 nL/min; 设置肽段参数为蛋白酶 Trypsin[KR/P], 0 最大漏切位点数, 7–25 个氨基

酸残基, 半胱氨酸烷基化固定修饰; Transition 参数为 2、3 母离子电荷, 1 子离子电荷, b、y 离子类型, 0.02 Da 离子匹配质量误差容忍度。

2 结果与分析

2.1 药物感受性测定结果

3 株 *E. rhusiopathiae* 中, AErS、AEr51 和 AEr31 对 26 种抗生素耐药率分别为 34.62% (9/26)、34.62% (9/26)和 26.92% (7/26), 其中 AErS 和 AEr31 对所有 β-Lactams 抗生素(PG、AMX、AMP、CA、CFZ、CH、CTR、CTX、Cef)敏感, 而 AEr51 除对 PG 耐受外, 对其他 β-Lactams 抗生素均敏感(表 2)。

表 2 3 株受试菌株对 26 种抗生素药敏试验结果
Table 2 Drug sensitivity test results of 26 antibiotics of 3 tested strains

抗生素名称 Antibiotics name	AEr51	AEr31	AErS
PG	22 (R)	30 (S)	29 (S)
AMP	28 (S)	28 (S)	27 (S)
AMX	22 (S)	30 (S)	28 (S)
CA	28 (S)	30 (S)	29 (S)
CFZ	28 (S)	30 (S)	30 (S)
CH	19 (I)	26 (S)	27 (S)
CTR	29 (S)	27 (S)	30 (S)
CFX	26 (S)	16 (I)	27 (S)
CTX	28 (S)	17 (I)	32 (S)
Cef	16 (I)	15 (I)	23 (S)
TE	22 (S)	24 (S)	21 (S)
DX	24 (S)	21 (S)	12 (R)
GEN	0 (R)	3 (R)	0 (R)
STR	4 (R)	3 (R)	0 (R)
RAN	0 (R)	0 (R)	0 (R)
NEO	0 (R)	0 (R)	0 (R)
SPT	18 (S)	16 (S)	15 (S)
FFC	18 (S)	20 (S)	19 (S)
ERT	14 (I)	22 (S)	21 (S)
Lin	0 (R)	12 (I)	4 (R)
TMP	0 (R)	0 (R)	0 (R)
SXT	0 (R)	0 (R)	0 (R)
Tim	0 (R)	0 (R)	0 (R)
ENR	19 (S)	20 (S)	19 (S)
CIP	20 (I)	23 (S)	22 (S)
Sul	24 (S)	22 (S)	25 (S)

注: S: 高敏; I: 中介; R: 耐药

Note: S: High sensitivity; I: Intermediary; R: Drug resistance

2.2 最小抑菌浓度 MIC 的测定结果

3株 *E. rhusiopathiae* 中, 除 AEr51 对 PG 达到高度耐药(MIC=32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\geq 16\text{--}20 \mu\text{g}/\text{mL}$)外, AErS 和 AEr31 对 PG、AMX 和 AMP 均高度敏感(MIC $\leq 0.025\text{--}0.780 \mu\text{g}/\text{mL}$); 且 AEr51 对 AMX 和 AMP 的 MIC 值分别为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其敏感程度稍低于 AErS 和 AEr31, 为中度敏感(MICs, 0.1–25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (表 3)。

2.3 RNA-Seq 分析及荧光定量验证结果

2.3.1 测序数据质量评估及基因组比对

AEr51、AErS 和 AEr31 样品的质量浓度分别为 1 270、636 和 302 ng/ μL ; $OD_{260/280}$ 分别为 2.15、2.16 和 2.22, $OD_{260/230}$ 分别为 2.24、1.25 和 1.10, 满足建库测序的要求。由转录组测序数据分析报告

表 3 AEr51、AErS 和 AEr31 对 3 种抗生素的 MIC 测定结果

Table 3 MIC determination results of AEr51, AErS and AEr31 for 3 antibiotics

菌株 Strains	抗菌药物的 MIC 值 MICs of the following antibiotics ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	PG	AMX	AMP
AEr51	32.000	4.000	2.000
AEr31	0.250	0.500	0.500
AErS	0.125	0.500	0.250

可知, AEr51、AErS 和 AEr31 分别获得 10 396 860、8 147 318 和 7 377 724 条原始序列, 对原始数据进行过滤后, 获得的 Clean Reads 分别为 9 869 052、8 018 178 和 7 264 632, 其错误率均为 0.03%; 基因组定位分析 AEr51、AErS 和 AEr31 的比对结果分别是 97.84%、96.75%和 96.36% (表 4), 表明该数据有较高准确性, 可直接用于后续分析。

2.3.2 差异基因表达分析

采用 HTSeq 软件, 以同时满足 $|\text{Log}_2(\text{Fold Change})| > 1$ 且 $P < 0.005$ 为标准, 对各样品差异表达基因进行筛选。从 AEr51/AErS 比较组共筛选到 668 个差异表达基因, 其中 434 个表达上调、234 个表达下调(图 1A); 从 AEr51/AEr31 比较组共筛选到 403 个差异表达基因, 其中 275 个表达上调、128 个表达下调(图 1B), 从中筛选出部分耐药相关差异表达基因(表 5)。

表 4 数据产出质量统计

Table 4 Data output quality statistics

样本名称 Sample name	原始数据 Raw data	过滤后数据 Filtered data	错误率 Error rate (%)	比对比例 Comparison ratio (%)
AEr51	10 396 860	9 869 052	0.03	97.84
AErS	8 147 318	8 018 178	0.03	96.75
AEr31	7 377 724	7 264 632	0.03	96.36

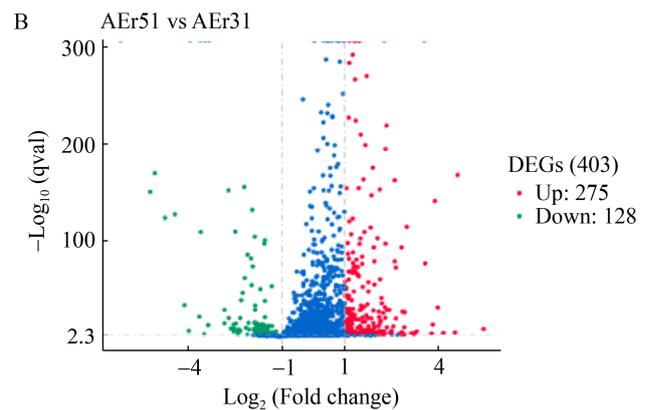
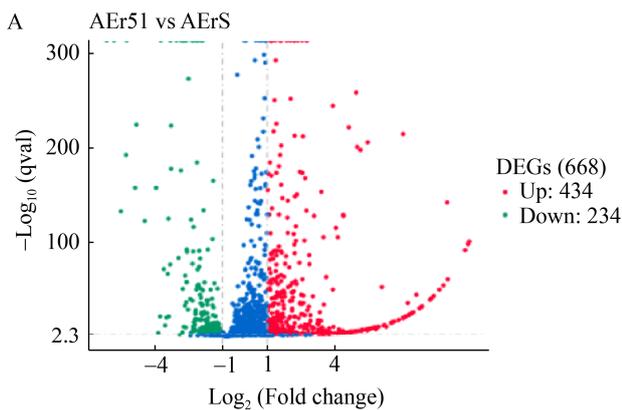


图 1 差异表达基因火山图

Figure 1 Volcano map of differentially expressed genes

注: A: AEr51/AErS 差异基因分布; B: AEr51/AEr31 差异基因分布。红色表示差异基因表达上调; 绿色表示差异基因表达下调; 蓝色表示无显著性差异表达基因

Note: A: AEr51/AErS differential gene distribution; B: AEr51/AEr31 differential gene distribution. Red indicates that differential gene expression is up-regulated; Green indicates that differential gene expression is down-regulated; Blue indicates that there is no significant differentially expressed gene

表 5 耐药相关差异表达基因

Table 5 Resistance-related differentially expressed genes

基因名称 Gene name	基因注释 Gene annotation	差异倍数 Log ₂ FC Difference multiple Log ₂ FC	
		AEr51/AErS	AEr51/AEr31
ERH_0042	Metallo-beta-lactamase family protein	1.962	–
ERH_0232	Drug resistance transporter%2C Bcr/CflA family	1.425	–
<i>mviN</i>	Integral membrane protein MviN	1.233	–
ERH_0226	ABC transporter%2C permease protein	4.627	4.277
ERH_1052	ABC transporter%2C ATP-binding protein	1.708	2.204
ERH_0095	ABC transporter%2C permease and ATP-binding protein	1.759	1.201
ERH_0186	Putative membrane protein	4.314	1.660
ERH_0199	Sugar ABC transporter%2C ATP-binding protein	1.087	1.266
ERH_0082	Transcriptional regulator%2C MarR family	1.558	1.552
ERH_0465	ABC transporter%2C ATP-binding protein	1.613	–
ERH_0690	ABC transporter%2C permease and ATP-binding protein	1.499	1.233
ERH_0986	ABC transporter%2C ATP-binding protein	1.344	2.302
ERH_0792	ABC transporter%2C permease and ATP-binding protein	–2.189	–1.632

Note: The gene is not contained

2.3.3 差异表达基因的 GO 富集分析和 KEGG Pathway 分析

GO 分析结果显示, AEr51/AErS 组差异表达基因共得到 30 个 GO 功能注释, 其中生物过程类 23 个、细胞组分类 1 个、分子功能类 6 个, 主要集中在化合物合成、RNA 代谢调控、催化活性、细胞膜及其相关组成成分、跨膜运输等功能(图 2A)。AEr51/AEr31 组差异表达基因共得到 30 个 GO 功能注释, 其中生物过程类 12 个、细胞组分类 18 个, 主要集中在细胞运动、跨膜运输、细胞代谢、细胞膜及其膜的组成部分等功能, 分子功能类无显著富集(图 2B)。

KEGG 分析显示, AEr51/AErS 组的 1 071 个差异表达基因共注释到 88 条信号通路, 其中有 581 个下调差异基因、490 个上调差异基因(图 3A); AEr51/AEr31 组的 1 086 个差异表达基因共注释到 86 条信号通路, 其中有 605 个下调差异基因、481 个上调差异基因(图 3B)。差异基因主要富集在代谢途径、次生代谢产物生物合成、ABC 转运系

统、双组分信号转导系统、鞭毛组装、 β -内酰胺抗性等通路。

2.3.4 差异表达基因的 qPCR 验证

随机筛选 7 个差异表达基因进行 qPCR 验证, 由图 4 可知, qPCR 验证结果与 RNA-Seq 分析结果基本一致, 而且诱导表达变化趋势相同, 证实 RNA-Seq 分析的结果具有可靠性。

2.4 TMT 定量蛋白质组学分析

2.4.1 差异蛋白及其亚细胞定位分析

对 AEr51、AEr31、AErS 进行 TMT 定量蛋白质组学分析, 共鉴定到 1 111 个蛋白质。以 1.2 倍为差异表达变化阈值(上调 Fold Change \geq 1.2, 下调 Fold Change \leq 0.83), 以 $P\leq 0.05$ 为显著性阈值筛选差异蛋白, AEr51/AErS 组共筛选到 167 个差异蛋白(86 个上调, 81 个下调); AEr51/AEr31 组共筛选到 159 个差异蛋白(80 个上调, 79 个下调)(图 5)。其中, AEr51/AErS 组和 AEr51/AEr31 组中位于细胞膜、细胞质、细胞外的蛋白分别占 50.00% (20 个)、42.50% (17 个)、7.50% (3 个)和 48.28% (14 个)、44.83% (13 个)、6.90% (2 个)(图 6)。

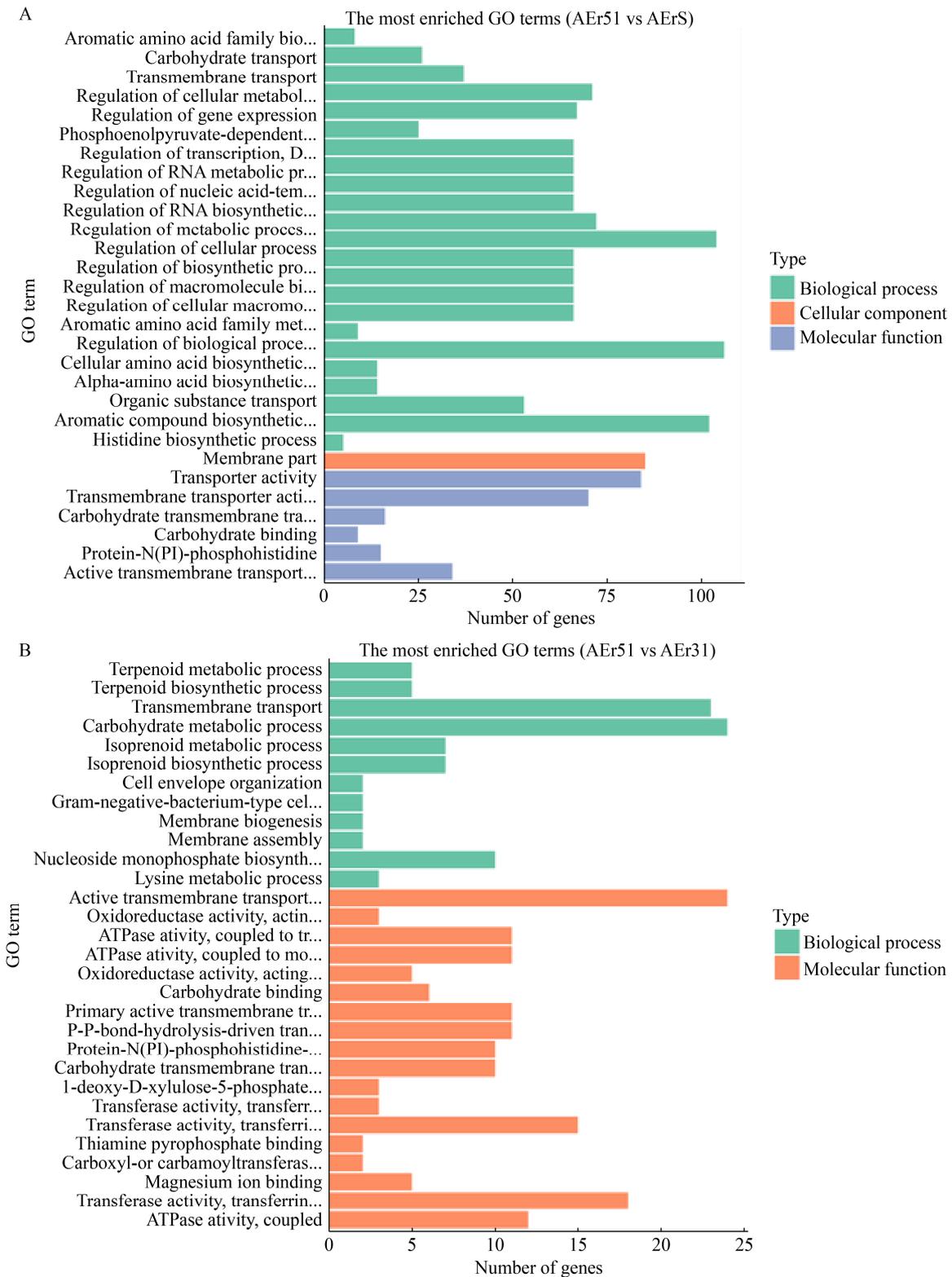


图 2 GO 功能富集

Figure 2 GO feature enrichment

Note: A: AEr51/AErS; B: AEr51/AEr31

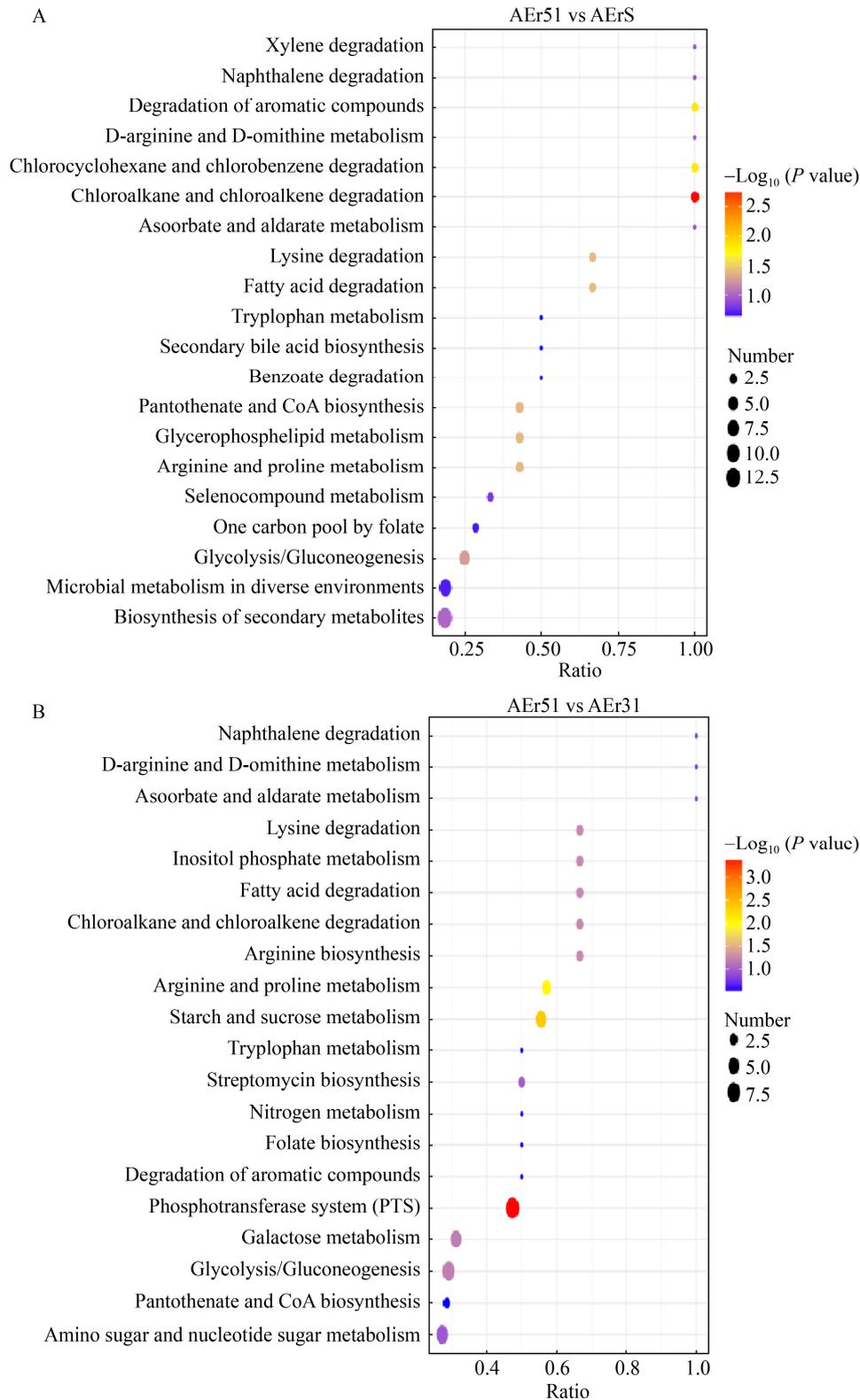


图3 KEGG 通路富集

Figure 3 KEGG pathway enrichment

Note: A: AEr51/AErS; B: AEr51/AEr31

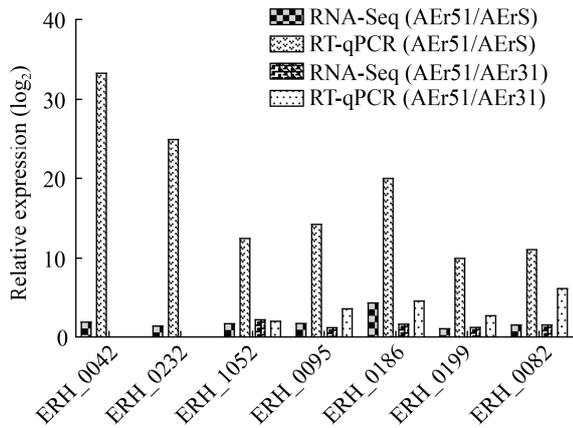


图4 部分差异表达基因 qPCR 验证结果

Figure 4 qPCR verification results of the differentially expressed genes

2.4.2 差异蛋白 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

GO 分析结果显示, AEr51/AErS 组的 167 个差异蛋白主要富集在细胞内细胞器部分、核糖体、核糖核蛋白复合物、细胞内核糖核蛋白复合物、核糖

体亚单位、细胞内非膜结合细胞器、细胞内细胞器、无膜细胞器等细胞组分(Cellular Component, CC)方面; 在与核糖体结构成分、结构分子活性、RNA 结合相关的蛋白质等分子功能(Molecular Function, MF)方面显著富集; 在与肽代谢、酰胺生物合成、肽生物合成、细胞蛋白代谢相关的蛋白质等生物进程(Biological Process, BP)方面显著富集(图 7A)。AEr51/AEr31 组的 159 个差异蛋白在 CC 方面与核糖体、细胞器组分相关的蛋白质显著富集; MF 方面与结构分子活性、核糖体成分及 RNA 转运相关的蛋白质显著富集; BP 方面与蛋白质合成、代谢及酰胺生物合成过程相关的蛋白质显著富集(图 7B)。

KEGG 分析结果显示, AEr51/AErS 组的 167 个差异蛋白显著富集在核糖体、丙酸代谢、氮代谢等通路(图 8A); AEr51/AEr31 组的 159 个差异蛋白显著富集在核糖体、氮代谢、嘧啶代谢等通路(图 8B)。

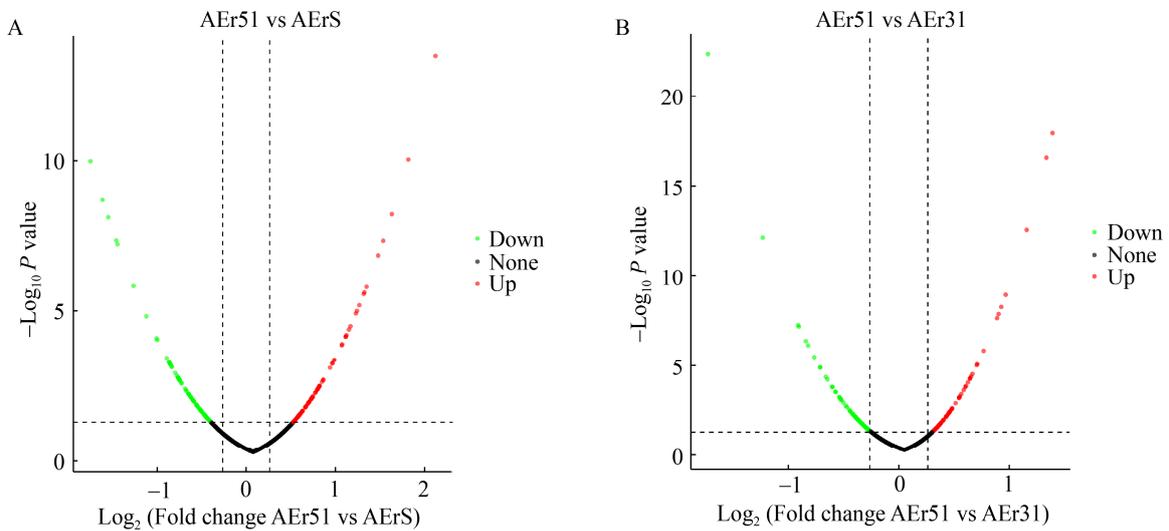


图5 差异蛋白火山图

Figure 5 Differential protein volcano

注: A: AEr51/AErS; B: AEr51/AEr31。红色: 显著差异表达上调蛋白; 绿色: 显著差异表达下调蛋白; 黑色: 无显著差异表达蛋白。筛选出的差异表达蛋白均以上调为主

Note: A: AEr51/AErS; B: AEr51/AEr31. Red: Significantly differentially expressed up-regulated protein; Green: Significantly differentially expressed down-regulated protein; Black: No significant differentially expressed protein. The differentially expressed proteins screened out are all up-regulated

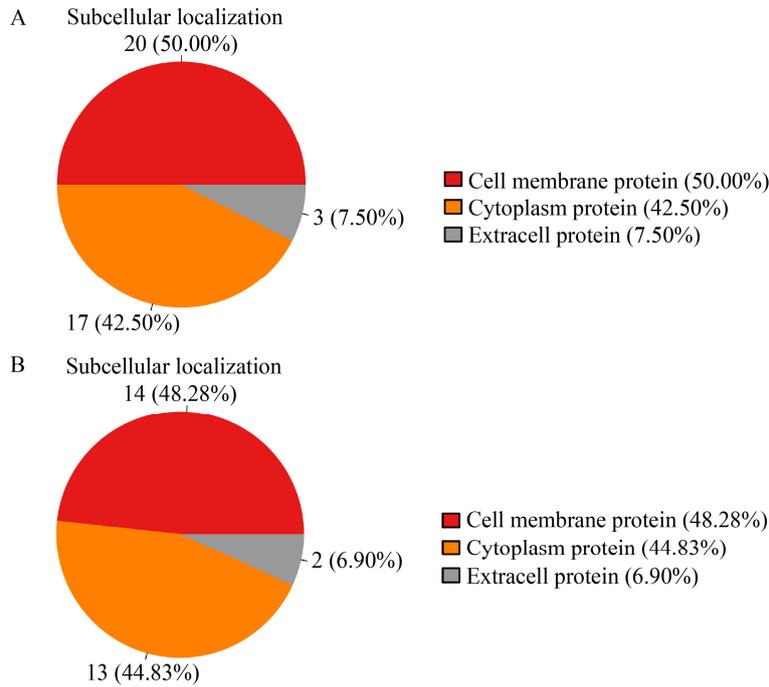


图 6 差异蛋白亚细胞定位分析

Figure 6 Subcellular localization of differential proteins

Note: A: AEr51/AErS; B: AEr51/AEr31.

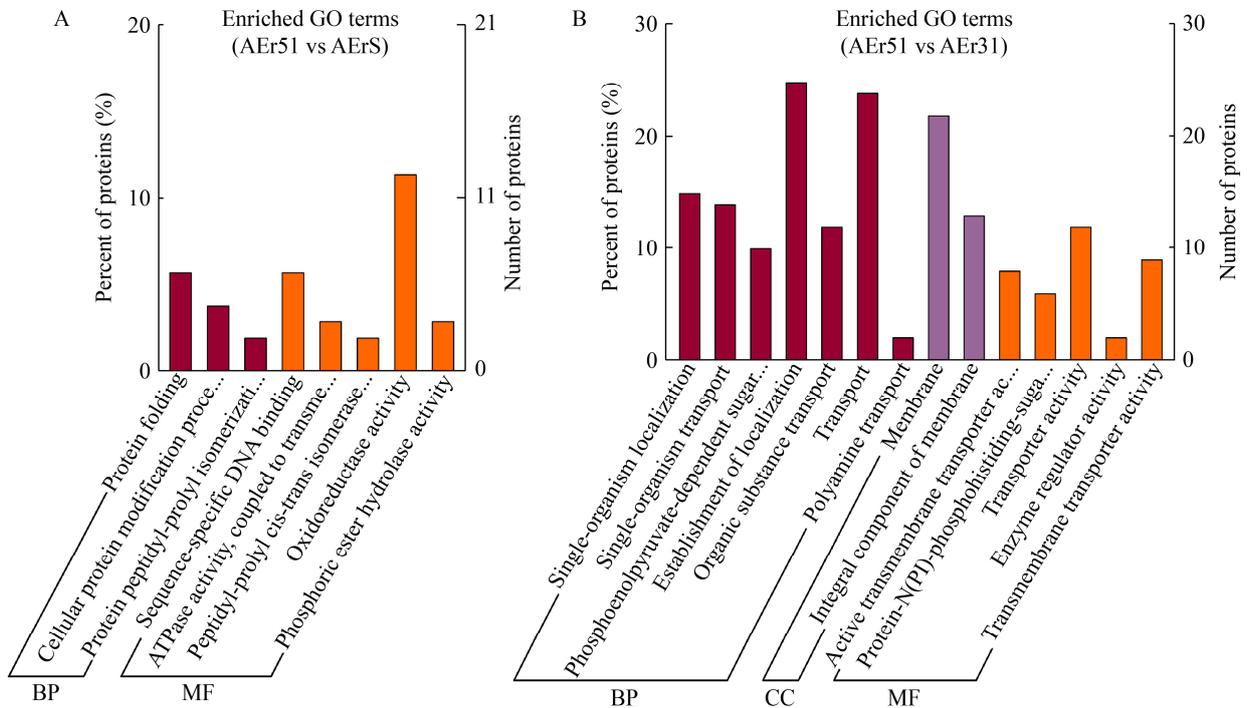


图 7 差异蛋白 GO 富集柱状图

Figure 7 Histogram of differential protein GO enrichment

Note: A: AEr51/AErS; B: AEr51/AEr31.

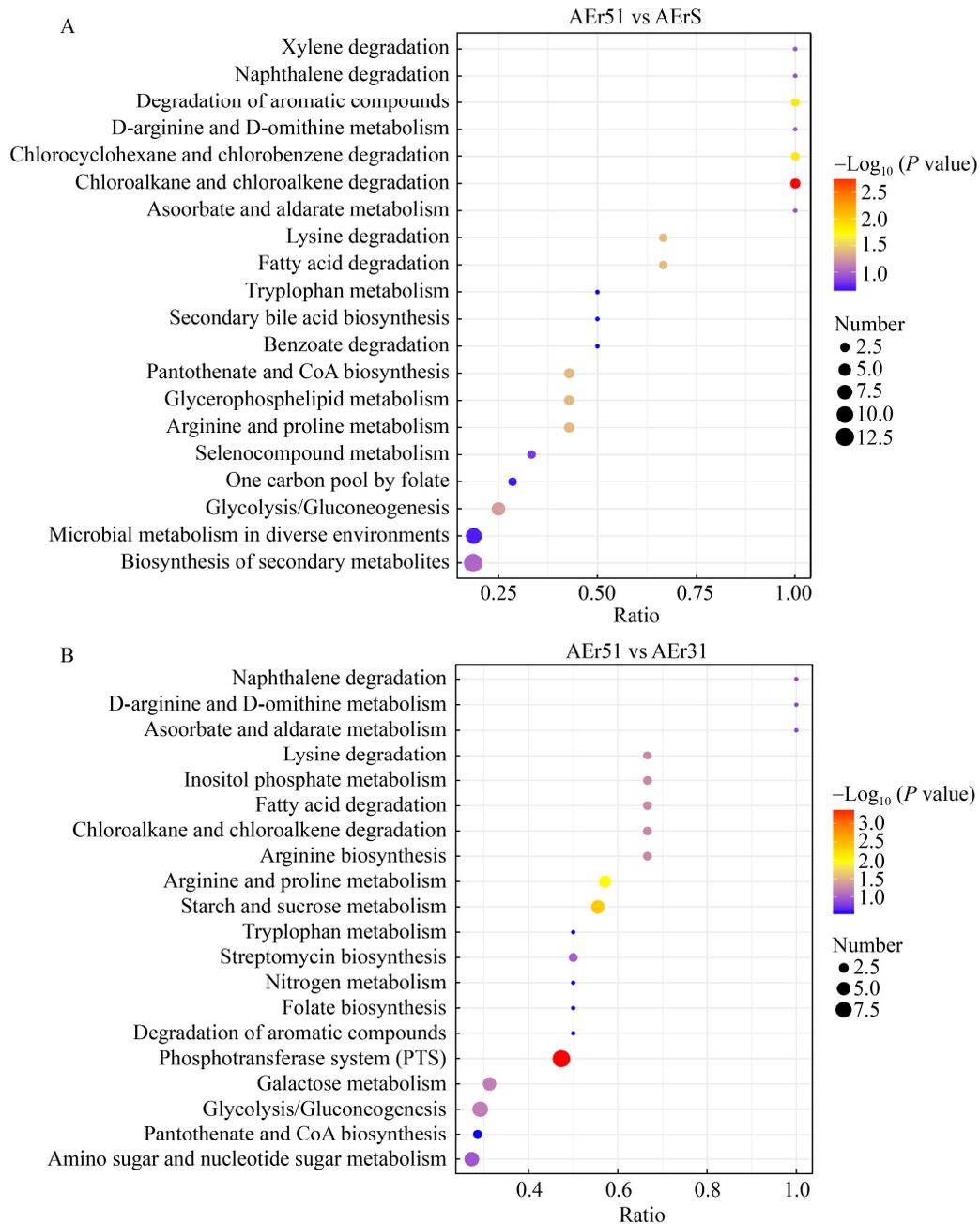


图 8 差异蛋白 KEGG 富集气泡图

Figure 8 Bubble chart of enrichment of differential protein KEGG

注: A: AEr51/AErS; B: AEr51/AEr31。图中纵轴为功能分类或通路, 横轴为相应通路中差异蛋白的数目与该通路鉴定出的总蛋白数目的比值, 值越大, 说明在该通路中差异蛋白富集程度越高。点的颜色代表超几何检验的 P 值, 颜色由蓝至红, 颜色越红, 值越小, 说明检验的可靠性越大, 越具有统计学意义。点的大小代表相应通路中差异蛋白的数目, 点越大, 该通路内差异蛋白就越多

Note: A: AEr51/AErS; B: AEr51/AEr31. The vertical axis in the figure is the functional classification or pathway, and the horizontal axis is the ratio of the number of differential proteins in the corresponding pathway to the total number of proteins identified in the pathway. The larger the value, the higher the enrichment of differential proteins in the pathway. The color of the point represents the P value of the hypergeometric test. The color ranges from blue to red. The redder the color, the smaller the value, indicating that the test is more reliable and more statistically significant. The size of the dot represents the number of differential proteins in the corresponding pathway. The larger the dot, the more differential proteins in the pathway

2.4.3 差异蛋白互作分析

对差异蛋白互作网络(PPI 网络)进行可视化展示, AEr51/AErS 组结果见图 9, AEr51/AEr31 组结果见图 10。图中每个节点表示一个蛋白, 节点大小表示与之互作蛋白的个数, 节点越大说明与之互作的蛋白数量越多, 表明该蛋白在网络中越重要。

节点颜色代表蛋白的差异表达情况, 红颜色代表此蛋白显著高表达, 绿颜色代表此蛋白显著低表达。

2.4.4 耐药相关蛋白筛选

以 1.2 倍为变化阈值, 对鉴定的差异蛋白进行分类统计, 共筛选出 18 个耐药相关蛋白, 主要包括 PBP 蛋白、ABC 转运蛋白、外膜蛋白等(表 6)。

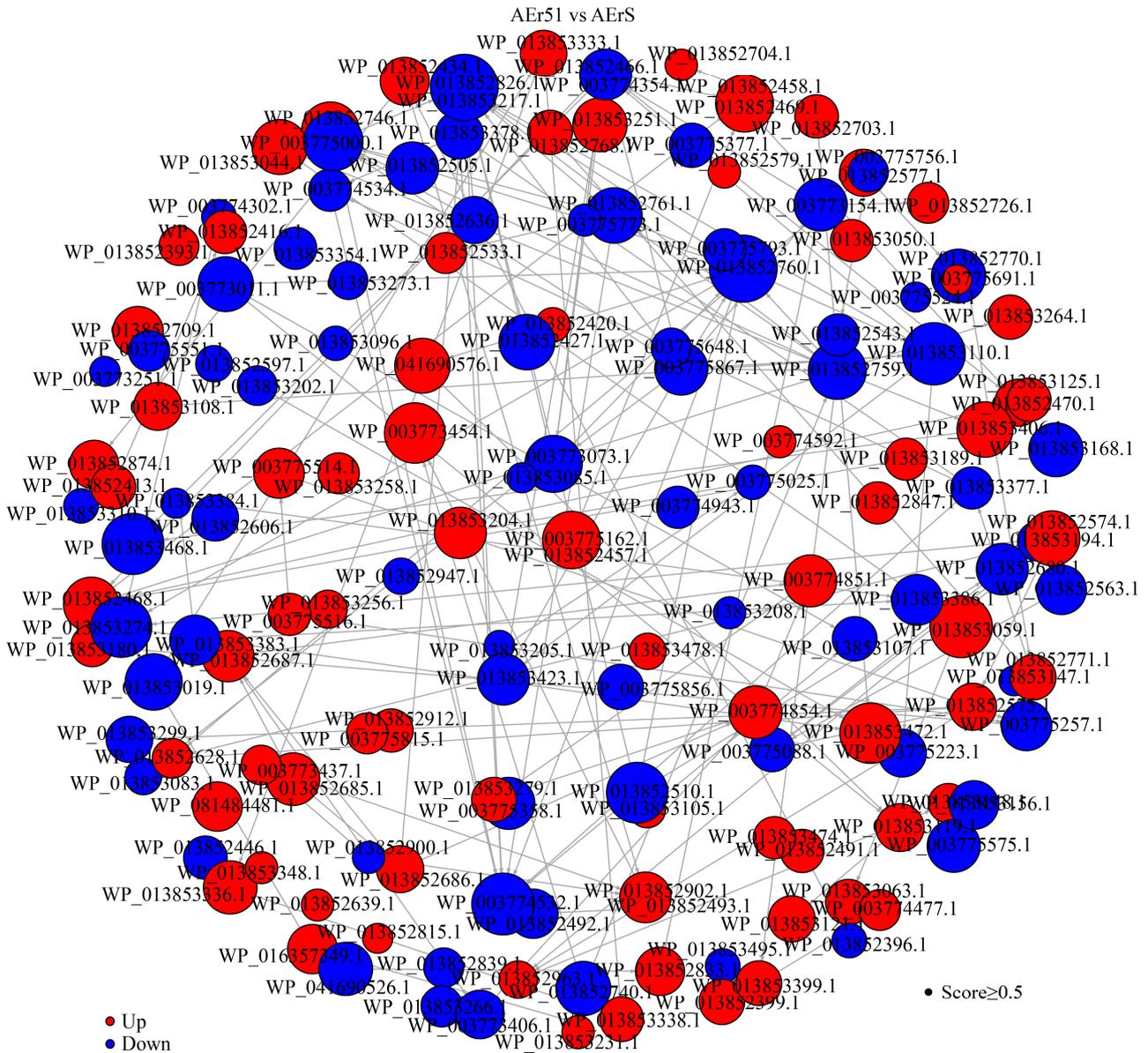


图 9 AEr51/AErS 组差异蛋白互作网络图

Figure 9 Interaction network of AEr51/AErS differential proteins

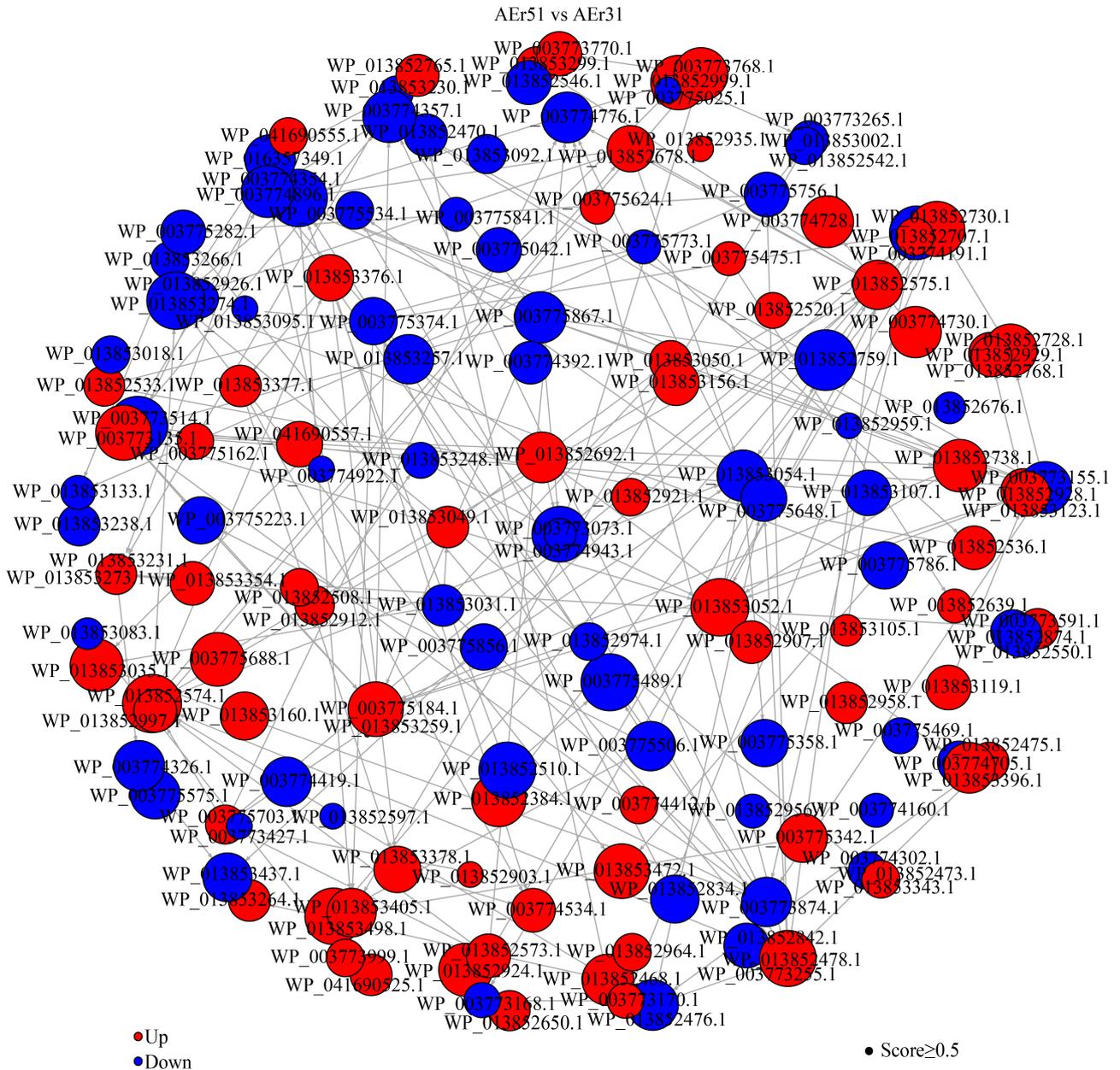


图 10 AEr51/AEr31 组差异蛋白互作网络图

Figure 10 Interaction network of AEr51/AEr31 differential proteins

2.4.5 PRM 靶向蛋白验证

随机筛选 7 个差异表达蛋白进行 PRM 靶向验证, 其验证结果与 TMT 结果基本一致(图 11)。

3 讨论与结论

猪丹毒是由 *E. rhusiopathiae* 引起的一种急性、热性人畜共患传染病, 属于我国农业农村部公布的

二类动物疫病, 不同年龄的猪均易感染此病^[1]。

β -Lactams 抗生素在治疗猪丹毒过程中发挥重要作用, 其中 PG 更是首选药物。然而, 由于兽医临床上抗生素的长期不合理使用, 近年来出现了对抗生素不同程度耐受的临床分离株。陆萍等^[12]测定了 2012–2013 年安徽省 8 个地区的 29 株

表 6 耐药相关差异蛋白

Table 6 Differentially expressed proteins associated with antibiotic resistance

蛋白名称 Protein name	蛋白注释 Protein annotation	差异倍数 Difference multiple Fold Change	
		AEr51/AErS	AEr51/AEr31
Pola	DNA polymerase I	1.765	—
Rplk	50S ribosomal protein L11	0.732	—
ERH_RS00600	ABC-type multidrug transport system	1.655	—
ERH_RS02415	ABC transporter ATP-binding protein	1.614	—
ERH_RS02420	FtsX-like permease family protein	1.681	—
ERH_RS03210	Hypothetical protein	1.981	1.269
ERH_RS03880	CBS domain-containing protein	1.589	—
ERH_RS07695	ABC transporter ATP-binding protein	0.298	1.346
ERH_RS06975	ABC transporter permease	1.818	—
ERH_RS02960	PBP family intramembrane metalloprotease	—	1.323
ERH_RS02415	ABC transporter ATP-binding protein	1.614	—
ERH_RS07745	ABC transporter ATP-binding protein	0.590	—
ERH_RS06980	ABC transporter ATP-binding protein	1.551	—
ERH_RS07685	ABC transporter permease	0.364	1.326
ERH_RS07235	ABC transporter ATP-binding protein	—	1.286
ERH_RS07680	ABC transporter substrate-binding protein	—	1.631
ERH_RS07230	ABC transporter ATP-binding protein	—	1.299
ERH_RS05065	ABC transporter permease	—	1.369

Note: —: The protein is not contained

E. rhusiopathiae 对 18 种常用抗菌药物的药物敏感性, 结果显示分离菌株对 AMP、CTR、PG、ERY、CTX 的敏感率分别达到 100%、100%、93.0%、89.7%、75.9%; 龚争等^[13]对 2017–2018 年华东地区猪场临床分离的 20 株 *E. rhusiopathiae* 进行药物敏感性测定, 发现 *E. rhusiopathiae* 对 PG、AMP、ERY、TIM、CEF、CTR 和 FFC 均敏感。本实验

室在 2018–2020 年间对安徽、江苏、山东、河北、广西部分地区的猪细菌病流行病学调查中, 获得一株具有 PG 耐受的 *E. rhusiopathiae* AEr51, 药敏结果显示 AEr51 对青霉素耐受, MIC 值为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 达到高水平耐药; 而对 AMX、AMP、CA、CFZ、CH、CTR、CTX、Cef 等 β -内酰胺类抗生素均敏感。虽然 *E. rhusiopathiae* PG 耐药株之前已有发现, 但从转录组学和蛋白质组学角度研究 *E. rhusiopathiae* 的 PG 耐药机理鲜少报道。因此, 本研究利用转录组学测序(RNA-Seq)技术和串联质谱标签法(TMT)定量蛋白质组学技术初步探究 *E. rhusiopathiae* 产生 PG 抗性的分子机制。

RNA-Seq结果显示 AEr51/AErS 组和 AEr51/AEr31 组分别筛选到 668 个和 403 个差异表达基因, 其中 AEr51 和 AEr31 中共同变化的耐药相关差异表达基因包括: 外排泵相关基因 *ERH_0226*、*ERH_1052*、*ERH_0095*、*ERH_0186*、*ERH_0199*、*ERH_0690*、*ERH_0986*、*ERH_0792*、*natB*; β -内酰胺酶相关基因 *ERH_0042*; 生物膜相关基因 *mviN*; 双组分系统相关基因 *cssS*、*yesM*、*ERH_0309*、*lytT*、

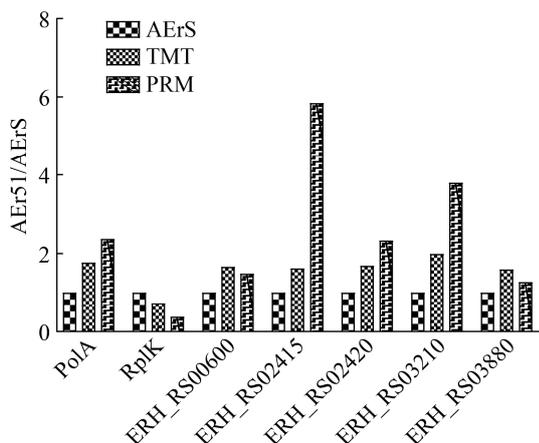


图 11 PRM 验证结果

Figure 11 Comparison between TMT and PRM quantification results

ERH_1189、*ERH_0312*、*ERH_0313*、*phoR*、*ERH_0920* 以及耐药转运体相关基因 *ERH_0232*。GO 功能分类发现, 上述差异表达基因主要参与跨膜运输、细胞黏附和细胞定位等生物学功能, 以及生物膜和膜的组成部分等细胞组成功能, 这些过程均与细菌耐药性密切相关。TMT 定量蛋白质组学结果显示, AEr51、AEr31 及 AErS 中共鉴定出 1 111 个差异表达的蛋白质, 其中耐药相关蛋白 18 个, 主要富集在 ABC 转运系统相关蛋白 *ERH_RS00600*、*ERH_RS07695*、*ERH_RS06975*、*ERH_RS02415*、*ERH_RS07745*、*ERH_RS06980*、*ERH_RS07685*、*ERH_RS07235*、*ERH_RS07680*、*ERH_RS07230*、*ERH_RS05065* 及 PBP 相关蛋白 *ERH_RS02960* 等。结合转录组学和蛋白质组学分析结果, 推测参与 *E. rhusiopathiae* 产生 PG 抗性的分子机制有外排泵、 β -内酰胺酶、生物膜的形成、双组分系统、ABC 转运系统和 PBP 相关蛋白等。

外排泵是一种存在于所有细菌细胞膜上的蛋白质, 能参与物质从细菌细胞内部到外部的过程, 是药物外排的关键组成部分, 也是细菌对抗生素产生耐药性的主要机制之一^[14]。细菌细胞膜上相关蛋白消耗能量, 将药物从细胞内排出, 以降低其在机体内的蓄积浓度, 而细菌长期处于亚抑菌浓度的药物环境会导致编码外排泵的基因发生过表达^[15], 在革兰氏阳性细菌中, *AcrAB*、*AcrD*、*MdtABC* 外排泵的过表达均能引起细菌耐药^[16]。在本研究中, AEr51 的 9 个外排泵基因均呈过表达状态, 表明 AEr51 产生耐药可能是多个外排泵过表达的结果。研究表明, 外排泵与细菌生物膜的形成存在一定联系, 外排泵蛋白的表达在生物膜细菌中显著上调, 生物膜的形成和外排泵对药物的直接排出大大提高了细菌对抗生素的耐药性^[17]。鞭毛在生物膜形成初期起着介导黏附作用, 为生物膜的形成提供动力^[18]。本研究中 *cssS* 基因表达量显著上调, 可通过调控 *E. rhusiopathiae* 鞭毛运动和生物膜形成能力改变其对抗生素的敏感性。

与革兰氏阴性菌相比, 革兰氏阳性菌水解

β -内酰胺环形成的 β -内酰胺酶并非 PG 抗性产生的关键原因, 其主要机制在于靶标青霉素结合蛋白 (Penicillin Binding Proteins, PBPs) 的突变^[19-20]。PBP 位于细菌细胞质膜上, 是 β -内酰胺类抗生素的主要作用靶位, 能够与这类抗生素发生特异性识别^[21]。本研究中, PBP 相关蛋白 *ERH_RS02960* 发生显著上调表达, 表明 AEr51 可通过调节 PBP 蛋白来调节细菌的耐药性。双组分系统广泛存在于原核生物细胞中, 能调控细菌对抗生素的耐受性, 而且双组分系统间也会相互影响。AEr51 双组分系统中部分相关基因的表达量发生了显著变化, 提示双组分系统不但能通过自我调节, 还能与其他系统发生作用, 调控相关耐药基因的表达, 利于细菌识别宿主环境并增强对不利环境的适应性。ABC 转运蛋白是一类高度保守的跨膜蛋白, 通过水解 ATP 获得能量进行物质转运, 其超家族成员寡肽渗透酶盒存在于多数细菌中, 调控细菌耐药的过程^[22]。AEr51 中 ABC 转运相关蛋白 *ERH_RS06975*、*ERH_RS00600* 和 *ERH_RS02415* 表达量均显著上调, 表明 AEr51 可影响 ABC 转运相关蛋白的表达, 进而参与细菌耐药性的调节过程。

细菌的 sRNA 能参与基因表达调控的过程, 是重要的转录后调控因子, 有助于细菌对环境变化的适应, 其中 sRNA 对细菌耐药机制的调控包括对外排泵系统的调控、对细菌细胞膜通透性的调控和对细菌生物膜的调控等^[9]。本研究的候选 sRNA 有 795 个, 表达水平存在显著差异的有 338 个, 而且每个候选 sRNA 都可比对到多个家族、对应多个靶基因, 虽然 AEr51 与 AErS 中候选 sRNA 及其所对应靶基因的表达水平存在一定差异, 但这不足以说明 sRNA 与 *E. rhusiopathiae* 耐药性之间有明确关系, 仍需进一步验证。综上, *E. rhusiopathiae* 对 PG 产生耐药性的过程受经典的靶位点突变、相关耐药蛋白基因的转运、外排泵和 PBP 相关蛋白表达的影响, 这种耐药性会引起双组分系统基因和 sRNA 表达的变化, 推测双组分系统和 sRNA 可能是调控 *E. rhusiopathiae* PG 抗性的重要途径。

REFERENCES

- [1] Chen PY. Veterinary Lemology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 251-252 (in Chinese)
陈溥言. 兽医传染病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 251-252
- [2] Opriessnig T, Forde T, Shimoji Y. *Erysipelothrix* spp.: past, present, and future directions in vaccine research[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 174
- [3] Ersdal C, Jørgensen HJ, Lie KI. Acute and chronic *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in lambs[J]. *Veterinary Pathology*, 2015, 52(4): 635-643
- [4] Bender JS, Irwin CK, Shen HG, Schwartz KJ, Opriessnig T. *Erysipelothrix* spp. genotypes, serotypes, and surface protective antigen types associated with abattoir condemnations[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2011, 23(1): 139-142
- [5] Chen ZL, Zeng ZL. Veterinary Pharmacology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 235 (in Chinese)
陈杖榴, 曾振灵. 兽医病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 235
- [6] Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from Gram-negative bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2011, 65(1): 455-478
- [7] Lambert PA. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57(10): 1471-1485
- [8] Qi YX, Liu YB, Rong WH. RNA-Seq and its applications: a new technology for transcriptomics[J]. *Hereditas*, 2011, 33(11): 1191-1202 (in Chinese)
祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq 及其应用[J]. *遗传*, 2011, 33(11): 1191-1202
- [9] Qiu P, Guo YR, Zhang ZH, Fan CL, Zhang DX, Cui CC, Liu MC. Progress in drug resistance mechanism of bacteria based on transcriptome technology[J]. *China Poultry*, 2019, 41(4): 45-49 (in Chinese)
裘鹏, 郭玉茹, 张泽辉, 范春玲, 张德显, 崔璨璨, 刘明春. 基于转录组学技术分析细菌耐药机制的研究进展[J]. *中国家禽*, 2019, 41(4): 45-49
- [10] Guo YR, Qiu P, Su HY, Gao X, Zhang DX, Zhang LY, Liu MC. Progress on bacterial resistance based on proteomics technology[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40(9): 89-92 (in Chinese)
郭玉茹, 裘鹏, 苏鸿雨, 高翔, 张德显, 张路遥, 刘明春. 基于蛋白质组学技术的细菌耐药性研究进展[J]. *动物医学进展*, 2019, 40(9): 89-92
- [11] Li L, Wang L, Wang WJ, Zhang RL, Xu J, Wang R, Zhao X. Fluoroquinolone resistant *Salmonella* proteomics analysis based on tandem mass tag and parallel reaction monitoring techniques[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(7): 1535-1545 (in Chinese)
李琳, 王磊, 王文静, 张瑞良, 徐军, 王瑞, 赵霞. 基于串联质谱标签法和平行反应监测技术的氟喹诺酮耐药沙门菌蛋白质组学分析[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(7): 1535-1545
- [12] Lu P, Huang XH, Li CF, Wei WT, Sun P, Wei JZ, Li Y. Isolation, identification and characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Anhui province[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(9): 1822-1828 (in Chinese)
陆萍, 黄晓慧, 李春芬, 魏文涛, 孙裴, 魏建忠, 李郁. 安徽部分地区猪丹毒杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(9): 1822-1828
- [13] Gong Z, Zhang JJ, Zhong DK. Biological characteristics and antibiotic resistance of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from East China[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(6): 174-182 (in Chinese)
龚争, 张俊杰, 钟登科. 华东地区猪丹毒杆菌分离株的生物学特征及其耐药性分析[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(6): 174-182
- [14] Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC, Lee SH. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 55
- [15] Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2001, 4(5): 500-508
- [16] Yu J, Schneiders T. Tigecycline challenge triggers sRNA production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 195
- [17] Bush K. Overcoming β -lactam resistance in Gram-negative pathogens[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2016, 8(9): 921-924
- [18] Wolska KI, Grudniak AM, Rudnicka Z, Markowska K. Genetic control of bacterial biofilms[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2016, 57(2): 225-238
- [19] Fisher JF, Mobashery S. β -lactam resistance mechanisms: Gram-positive bacteria and *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2016, 6(5): a025221
- [20] Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-Seq: accounting for selection bias[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(2): R14
- [21] Reza A, Sutton JM, Rahman KM. Effectiveness of efflux pump inhibitors as biofilm disruptors and resistance breakers in Gram-negative (ESKAPEE) bacteria[J]. *Antibiotics*, 2019, 8(4): 229
- [22] Zhou W. Study on the quinolone resistance mechanism of *Vibrio harveyi* selected *in vitro*[D]. Zhanjiang: Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2016 (in Chinese)
周维. 体外诱导哈维氏弧菌对喹诺酮类药物耐药机制的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文, 2016