

白栓成, 杨澜, 罗湘, 等. 大肠埃希菌质粒编码的 bla_{KPC-2} 基因介导碳青霉烯类药物低水平耐药的分子机制 [J]. 华南农业大学学报, 2025, 46(3): 326-335.
BAI Shuancheng, YANG Lan, LUO Xiang, et al. Molecular mechanism of plasmid-encoded bla_{KPC-2} gene mediating low-level resistance to carbapenems in *Escherichia coli* [J]. Journal of South China Agricultural University, 2025, 46(3): 326-335.

大肠埃希菌质粒编码的 bla_{KPC-2} 基因介导碳青霉烯类药物低水平耐药的分子机制

白栓成¹, 杨澜¹, 罗湘¹, 黄丽雅¹, 王雨欣¹, 王熔¹, 廖凤婷¹, 廖晓萍²

(1 玉林师范学院 智慧农业学院, 广西 玉林 537000; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】明确碳青霉烯酶编码质粒 p21QH43K-KPC 从肺炎克雷菌 *Klebsiella pneumoniae* 转移到大肠埃希菌 *Escherichia coli* 后介导碳青霉烯类药物低水平耐药的分子机制。【方法】采用构建 EZ-Tn5 转座子突变文库、基因敲除、转录组测序和全基因组测序 (WGS) 等手段, 探究 bla_{KPC-2} 基因在大肠埃希菌中对美罗培南产生低水平耐药的分子机制。【结果】通过构建接合子 EC600/p21QH43K-KPC 的 EZ-Tn5 转座子突变文库, 获得 1 株对美罗培南耐药水平增强的转座子突变株 EC600/p21QH43K-KPC-130(MIC=8.000 mg/L)。WGS 结果和 Mauve 分析显示, 该转座子插入到染色体 *ompR* 基因, 同时发现了 2 个点突变基因 *ltrA* 和 *iron*。基因敲除发现, 只有 *ompR* 缺失突变体对碳青霉烯的敏感性降低, 并且可以通过基因回补恢复这一表型。【结论】质粒编码的 bla_{KPC-2} 基因在大肠埃希菌中介导碳青霉烯类药物低水平耐药与 *ompR* 对 bla_{KPC-2} 基因的调控有关。

关键词: 大肠埃希菌; *OmpR* 基因; 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶-2; 碳青霉烯类药物; 耐药性; 分子机制

中图分类号: S859

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2025)03-0326-10

Molecular mechanism of plasmid-encoded bla_{KPC-2} gene mediating low-level resistance to carbapenems in *Escherichia coli*

BAI Shuancheng¹, YANG Lan¹, LUO Xiang¹, HUANG Liya¹, WANG Yuxin¹,

WANG Rong¹, LIAO Fengting¹, LIAO Xiaoping²

(1 Smart Agriculture College, Yulin Normal College, Yulin 537000, China; 2 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To elucidate the molecular mechanism by which the carbapenemase-encoding plasmid p21QH43K-KPC is transferred from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*, and mediates low-level resistance to carbapenem drugs in *E. coli*. 【Method】The construction of EZ-Tn5 transposon mutation library, CRISPR-Cas9-mediated gene knockout, transcriptome sequencing and whole genome sequencing (WGS) were used to determine the regulatory mechanism of low-level resistance to meropenem mediated by the bla_{KPC-2} gene in *E. coli*. 【Result】A transposon mutant EC600/p21QH43K-KPC-130 with enhanced meropenem resistance (MIC=8.000 mg/L) was obtained by constructing the EZ-Tn5 transposon mutation library of the EC600/

收稿日期: 2024-11-05 网络首发时间: 2025-03-27 08:57:37

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20250326.1701.002>

作者简介: 白栓成, 主要从事兽医病原微生物耐药性的风险评估与控制研究, E-mail: 1556042576@qq.com

基金项目: 玉林师范学院高层次人才科研启动基金 (G2024ZK13); 国家重点研发计划 (2023YFD1800100); 广东省珠江人才计划本地创新研究团队项目 (2019BT02N054)

p21QH43K-KPC conjugon. WGS and Mauve analysis revealed that the transposon had inserted into one chromosomal gene *ompR*, and two point mutation genes of *iron* and *ltrA* were found. However, through gene knockout, only *ompR* deletion mutants exhibited reduced sensitivity to carbapenem that could be restored by gene complementation. 【Conclusion】The molecular mechanism of the *bla*_{KPC-2} gene encoded on the plasmid mediating low-level resistance to carbapenems in *E. coli* is related to the regulation of *bla*_{KPC-2} gene by *ompR*.

Key words: *Escherichia coli*; *OmpR* gene; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2; Carbapenems; Drug resistance; Molecular mechanism

碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌 (Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP) 已构成全球公共卫生威胁^[1-2], 其主要耐药机制是携带碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC}, 其中, 在临床 CRKP 中, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2 (KPC-2) 亚型最为普遍, 可以水解所有已知的 β -内酰胺类药物, 包括碳青霉烯类^[3]。*bla*_{KPC-2} 基因通常编码在可转移质粒的转座子结构中, 特别是在肠杆菌科细菌中广泛流行的 IncFII 质粒, 这使得 *bla*_{KPC-2} 能够从克雷伯菌传播到其他肠杆菌科细菌, 包括大肠埃希菌 *Escherichia coli*^[4]。

有关研究发现, 大多数产 KPC-2 肺炎克雷伯菌株对美罗培南高度耐药 ($8 \leq \text{MIC} \leq 256 \text{ mg/L}$)^[5-6]。然而, 在部分对美罗培南高度耐药的产 KPC-2 肺炎克雷伯菌中, 当携带 *bla*_{KPC-2} 的质粒从肺炎克雷伯菌供体菌转移到大肠埃希菌受体中时, 获得的携带 *bla*_{KPC-2} 质粒的接合子对美罗培南表现出低水平耐药 ($\text{MIC} < 1 \text{ mg/L}$)^[7-9]。值得注意的是, 这些携带 *bla*_{KPC-2} 质粒的复制子呈现多样性, 包括 IncFII、IncFIB 和 IncHIB 等, 同时, 这些携带 *bla*_{KPC-2} 质粒的肺炎克雷伯菌供体菌的多位点序列分型 (Multi-locus sequence typing, MLST) 类型也呈现多样性, 包括 ST11、ST76、ST147 和 ST273 等, 这暗示了肺炎克雷伯菌中携带 *bla*_{KPC-2} 质粒转移至大肠埃希菌后介导美罗培南低水平耐药的现象较为普遍。另外, 还发现产 KPC 大肠埃希菌野生菌对美罗培南具有高度耐药性 ($\text{MIC} \geq 8 \text{ mg/L}$), 然而, 其携带 *bla*_{KPC-2} 质粒转移至美罗培南敏感的大肠埃希菌受体菌后, 携带 *bla*_{KPC-2} 质粒仍然在大肠埃希菌中介导美罗培南低水平耐药 ($\text{MIC} < 1 \text{ mg/L}$)^[10-12]。此外, 还发现产气单胞菌菌株中携带 *bla*_{KPC-2} 的 IncP-6 质粒转移至大肠埃希菌 DH10B 受体菌后, 该质粒介导美罗培南低水平耐药 ($\text{MIC} = 0.125 \text{ mg/L}$)^[13]。然而, 大肠埃希菌质粒携带的 *bla*_{KPC-2} 基因介导对美罗培南低水平耐药的潜在机制仍不清楚。

华南农业大学兽医药理与毒理学课题组前期

报道了一株分离自青海湖野生候鸟且对美罗培南耐药 ($\text{MIC} = 64 \text{ mg/L}$) 的 ST11 CRKP(21QH43K), 其携带 *bla*_{KPC-2} 基因, 位于可转移的 IncFII 质粒 (p21QH43K-KPC) 上^[3]。将该质粒通过接合转移的方式转入大肠埃希菌 EC600 中, 发现接合子 EC600/p21QH43K-KPC 对美罗培南表现出低水平耐药 ($\text{MIC} = 0.25 \text{ mg/L}$)。在临床上这类低水平碳青霉烯耐药大肠埃希菌无法被常规耐药筛查 (临床折点通常设定阈值 $\geq 2 \text{ mg/L}$) 有效识别而易被忽略, 其可能通过水平基因转移持续释放 *bla*_{KPC-2} 等关键耐药基因。因此, 为预防这一重要耐药基因向其他菌种传播, 肠杆菌科细菌中碳青霉烯酶基因调控低水平耐碳青霉烯类抗生素的分子机制亟待进一步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 本研究使用的所有菌株列于表 1。CRKP 菌株 21QH43K 分离自 2020 年青海省青海湖候鸟粪便样品, 经二、三代混合测序, 获得携带 *bla*_{KPC-2} 基因的 IncFII 质粒 p21QH43K-KPC 完整序列, 通过接合转移获得接合子 EC600/p21QH43K-KPC。质控菌株: 大肠埃希菌 ATCC 25922, 大肠埃希菌标准菌株: EC600 和 MG1655, 购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

1.1.2 试剂与药品 细菌 DNA 提取试剂盒和同源重组酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; LB 肉汤/琼脂培养基、水解酪蛋白胨 (Mueller Hinton, MH) 肉汤/琼脂培养基和麦康凯琼脂培养基, 购自广州环凯微生物科技有限公司; DNA marker DL2000 和 Premix Taq 为 TaKaRa 公司产品; 受试药物美罗培南 (Meropenem, MEM)、亚胺培南 (Imipenem, IMP)、厄他培南 (Ertapenem, ERT)、磷霉素 (Fosfomycin, FOS)、阿米卡星 (Amikacin, AMK)、头孢噻肟 (Cefotaxime, CTX)、头孢西丁 (Cefoxetine, FOX)、氨苄西林 (Ampicillin, AMP)、头

表 1 本研究使用的菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

类型 Type	名称 Name	用途 Purpose
菌株 Strain	21QH43K	临床菌 21QH43K
	ATCC700603	肺炎克雷伯菌工程菌
	$\Delta ompR$	<i>ompR</i> 基因敲除菌
	$\Delta ompC$	<i>ompC</i> 基因敲除菌
	$\Delta ompF$	<i>ompF</i> 基因敲除菌
	Δbla_{KPC-2}	<i>bla_{KPC-2}</i> 基因敲除菌
	$\Delta ltrA$	<i>ltrA</i> 基因敲除菌
	$\Delta iron$	<i>iron</i> 基因敲除菌
	<i>E. coli</i> DH5 α	用于构建质粒的菌株
	WM3064	用于基因敲除的工程菌
	<i>E. coli</i> 600	用于接合转移的工程菌
	MG1655	用于接合转移的工程菌
质粒 Plasmid	BL21	用于蛋白表达的菌株
	pSGKP-tet	用于基因敲除的工程质粒
	pCasKP-APR	用于基因敲除的工程质粒
	pSZU-Apr	用于基因敲除的工程质粒
	<i>phxCDABE</i>	用于验证 <i>bla_{KPC}</i> 基因启动子活性的工程质粒
	pGEN-APR	用于克隆 <i>bla_{KPC}</i> 基因的工程质粒
	pET28a (+)-kan	用于 OmpR 蛋白表达的工程质粒

孢他啶 (Ceftazidime, CAZ)、四环素 (Tetracycline, TET)、氨曲南 (Aztreonam, ATM)、环丙沙星 (Ciprofloxacin, CIP)、链霉素 (Streptomycin, STR)、安普霉素 (Apramycin, APR)、利福平 (Rifampicin, RIF) 购自赛默飞科技公司; L-阿拉伯糖购自默克 Sigma 公司; RNA 提取试剂盒购自北京百奥创新科技有限公司; iScript cDNA 合成试剂盒购自 Bio-Rad 公司; 试验所用引物列于表 2。

1.1.3 主要仪器 HHVE-50 高压灭菌锅, 日本 HIRAYMA 公司产品; AE150 电子分析天平, 瑞士 METTLER 公司产品; 超净工作台, 苏州净化设备有限公司产品; 涡旋振荡仪, 德国艾卡公司产品; 恒温培养箱, 上海申贤恒温设备厂产品; 离心机、微量移液器和 Labcycler PCR 扩增仪, 德国 Eppendorf 公司产品; 酶标定量测定仪, 美国贝克曼公司产品; NanoDrop OneC 微量紫外可见分光光度计, 赛默飞科技公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种复苏 从冰箱中取出所需菌株, 用移液枪吸取 10 μ L 菌液, 将其接种于 900 μ L 新鲜的

LB 肉汤中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 8 h。将复苏的菌株以四区划线法接种于麦康凯琼脂培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱过夜培养。次日, 从麦康凯琼脂培养基上挑取荷包蛋样的单个菌落, 并连续传代 3 次, 以保证菌体的活力达到正常水平。

1.2.2 微量肉汤稀释法药敏试验 采用微量肉汤稀释法测定大肠埃希菌对美罗培南、亚胺培南、厄他培南、磷霉素、阿米卡星、头孢噻肟、头孢西丁、氨苄西林、头孢他啶、四环素、氨曲南和环丙沙星的 MIC, 按照美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)2023 年标准^[14] 执行。以大肠埃希菌 ATCC 25922 为质量控制菌株。

1.2.3 接合转移试验 以大肠埃希菌 MG1655 作为受体菌, 将孵育至对数生长期的供体菌和受体菌在 LB 肉汤中按体积比 1:4 混合均匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后, 接种于含美罗培南 (0.25 mg/L) 和链霉素 (1000 mg/L) 的 LB 琼脂中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取疑似接合子, 通过 PCR 扩增测序证实接合子是否受到污染和 *bla_{KPC-2}* 基因是否存在^[15]。

1.2.4 EZ-Tn5 转座子突变文库的构建 使用 EZ-Tn5 转座酶系统^[16] 创建 EC600/p21QH43K-KPC 染色体突变文库。将携带 EZ-Tn5 的质粒 pCat-APR 通过接合转移的方式接合到 EC600/p21QH43K-KPC 中, 获得突变文库, 并将所有突变文库涂布于添加 50 mg/L 安普霉素的 LB 琼脂板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 然后把琼脂板上的单菌接种到 2 mg/L 美罗培南药板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 把琼脂板上的单菌保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.2.5 大肠埃希菌缺失株和回补株的构建 所有大肠埃希菌的基因敲除试验都是通过 CRISPR-Cas9 介导的基因组编辑方法^[17] 产生的。简单地说, 将设计好的 sgRNA 克隆到 pSGKP 质粒上, 利用 PrimeSTAR DNA 聚合酶 (TaKaRa) 进行融合 PCR 扩增目的基因的同源臂; 将质粒 pSGKP-sgRNA 及其匹配的同源臂电转化到含有 pCas-kp 的大肠埃希菌感受态细胞中, 并在添加 1-阿拉伯糖质量分数为 0.2% 的 LB 中培养; 用安普霉素和利福平在 30 $^{\circ}$ C 下选择转化子, 并进行 DNA 测序验证; 最后, 用质量分数为 5% 的蔗糖溶液在 42 $^{\circ}$ C 下固化质粒。

以 EC600/p21QH43K-KPC 为模板, 扩增 *ompR* 连同其启动子基因片段。以 pGEN 质粒为载体, 在 *Sal* I 酶切位点处进行反向扩增, 通过同源重组酶将反向扩增的载体和 *ompR* 连同其启动子基因片段进行同源重组, 提取质粒, 进行 Sanger 测序确

表 2 本研究使用的 PCR 引物
Table 2 PCR primers used in this study

试验 Test	引物 Primer	引物序列 (5'→3') Primer sequence
RT-qPCR	KPC-qPCR-F	ccactgggcgcgcacctatt
	KPC-qPCR-R	tgttaggcgcccgggtgtag
	16S-F	cctacgggaggcagcag
	16S-R	attaccgcggtgctgg
敲除 <i>bla</i> _{KPC-2}	KPC-N20-F	ttgggcgtcaacgggcagtagtttagagctagaaatagcaagtt
Knock out <i>bla</i> _{KPC-2}	KPC-N20-R	tactgcccgttgacgcccactagattatacctaggactgagc
	KPC-500-F1	tttttgatatcgaattcctgcagccccgattgaacctatgaccgaac
	KPC-500-R1	gcattgaccttgcatcttc
	KPC-500-F2	gaagatgccaaggtcaatgcggtatccatcgctacacac
	KPC-500-R2	ggccgctctagaagtagtggtacccccgtcaagatctacaaccacagc
	pSGKPtestF	tctcgtttggattgcaactg
	pSGKPtestR	tgcttccggctcgtatgttg
敲除 <i>ompR</i>	ompR-N20-F	agtggaccgtatcgtaggccgttttagagctagaaatagcaagtt
Knock out <i>ompR</i>	ompR-N20-R	ggcctacgatacgggtccactactagtattatacctaggactgagc
	ompR-500-F1	atatcgaattcctgcagccccgattaacataccagctcgc
	ompR-500-R1	gtgcgcattatcaaacagac
	ompR-500-F2	gtctgttgataatgcgcacctcatcgtcaccttgctg
	ompR-500-R2	ctagaagtagtggtacccccgttcgagatcgaccaacg
	pSGKPtestF	tctcgtttggattgcaactg
	pSGKPtestR	tgcttccggctcgtatgttg
<i>ompR</i> 基因回补	ompR-F	gcggatcccggtaccaagcttgacaccctcgttgattccctttgtct
<i>ompR</i> gene complementation	ompR-R	agctaactcacattaattgcgttgccgtacgggcaaataaacttc
	pGEN-F	ggtgtcaagcttggtacc
	pGEN-R	gcgcaacgcaattaatgtga
	pGENtestF	ggaacgaagccgccttaacc
	pGENtestR	cttgagcggaactgcctacc

认, 最终质粒命名为 pGEN-ompR, 把质粒 pGEN-ompR 以电转的方式转入大肠埃希菌 EC600ΔompR/p21QH43K-KPC, 最终获得 *ompR* 基因回补株 EC600ΔompR::ompR/p21QH43K-KPC。

1.2.6 生长曲线测定 将培养至对数期 ($D_{600\text{ nm}}=0.50$) 的目标菌株在 LB 肉汤中稀释至 $D_{600\text{ nm}}=0.05\sim0.10$, 在 96 孔板中每孔加入 200 μL 稀释后的菌液, 每个目标菌株设置 3 个重复, 在 37 ℃ 下孵育。每 1 h 测量 1 次菌液 $D_{600\text{ nm}}$, 持续 12 h。

1.2.7 全基因组测序 (WGS) 基因组 DNA 文库的构建与序列测定使用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 按照操作说明, 提取各处理组的大肠埃希菌分离株的基因组 DNA; 通过浓度测定和琼脂糖凝胶电泳, 初步质检合格后, 构建 Illumina(2×250 bp) 文库, 利用 Illumina Hisseq 平台进行测序, 下机数

据经质控和去除接头后运用 SPAdesv3.6.2 对原始数据进行拼接, 拼接后的数据使用 Quast 软件进行质控。将拼接成功的序列用 Mauve、Eazyfig 软件进行基因组对比分析。

1.2.8 转录组测序分析 大肠埃希菌 EC600/p21QH43K-KPC 和 EC600ΔompR/p21QH43K-KPC 通过 0.064 mg/L 的美罗培南 LB 肉汤富培养至对数生长期后, 使用 OMEGA 试剂盒提取 EC600/p21QH43K-KPC 和 EC600ΔompR/p21QH43K-KPC 菌株中的总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的纯度和完整性, 并用 Qubit 2.0 定量 RNA 浓度。构建转录组测序文库, 使用 IlluminaHiSeq 平台进行测序。将原始测序 Reads 映射到大肠埃希菌 EC600 的参考基因组 (Accession 登录号: PRJNA1051772) 上。使用 NGS QC Toolkit 软件针

对 fastq 格式的高通量测序原始数据 (Raw reads) 进行质控。使用 DESeq R package 的 estimate Size Factors 函数进行数据标准化, 并使用 nbinomTest 函数计算差异比较的 P 值和差异倍数 (Fold change, FC)。针对 $P<0.05$ 且 $\log_2 FC>1.5$ 的差异基因, 使用微生信分析平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 比较试验组和对照组的差异表达基因, 对每个比较组合的差异基因进行数目统计, 制作成火山图, 并进行 GO、KEGG 分析。

1.2.9 RT-qPCR 试验 采用紫外可见分光光度计对大肠埃希菌菌株 EC600/p21QH43K-KPC、EC600ΔompR/p21QH43K-KPCEC600/p21QH43K-KPC 和 EC600ΔompR::ompR/p21QH43K-KPC 的总 RNA 进行定量, 并使用 iScript cDNA 合成试剂盒将 1 μg 的总 RNA 进行反转录合成 cDNA。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测系统进行 cDNA 的 PCR 扩增, 并采用特异性引物, 以 16S rRNA 表达为内参进行归一化, 计算各基因的相对

表达量。
1.2.10 数据分析 利用 GraphPad Prism 8.0 软件中的 Student's t -test 统计学方法分析数据并作图。

2 结果与分析

2.1 基于转座子突变文库筛选获得目标基因 *ompR*

为了验证 p21QH43K-KPC 在其他大肠埃希菌中是否有相同的耐药表型趋势, 我们通过接合转移把质粒 p21QH43K-KPC 转移到大肠埃希菌 MG1655, 发现接合子 MG1655/p21QH43K-KPC 对美罗培南同样表现出低水平耐药 (MIC=0.250 mg/L) (表 3)。然而, 前期研究^[3]发现, 通过接合转移把质粒 p21QH43K-KPC 转移到肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 中, ATCC 700603/p21QH43K-KPC 对美罗培南表现出中等水平耐药 (MIC=4.000 mg/L), 与大肠埃希菌 EC600/p21QH43K-KPC 相比, 质粒 p21QH43K-KPC 对美罗培南的耐药性增加了 31 倍。

表 3 携带 *bla*_{KPC-2} 的质粒 p21QH43K-KPC 在不同遗传背景菌株中介导对碳青霉烯类药物的耐药表型
Table 3 Carbapenems resistance conferred by *bla*_{KPC-2}-carrying plasmid p21QH43K-KPC in strains with different genetic backgrounds

菌株 Strain	最小抑菌浓度/(mg·L ⁻¹) Minimal inhibitory concentration		
	美罗培南 Meropenem	亚胺培南 Imipenem	厄他培南 Ertapenem
21QH43K	64.000	16.000	>64.000
ATCC 700603	0.064	0.032	0.064
ATCC 700603/p21QH43K-KPC	4.000	4.000	8.000
EC600	0.016	0.125	0.008
EC600/p21QH43K-KPC	0.125	0.500	0.250
MG1655	0.016	0.125	0.002
MG1655/p21QH43K	0.125	0.500	0.250
EC600/p21QH43K-KPC-130	8.000	4.000	4.000

为了探究质粒 p21QH43K-KPC 携带的 *bla*_{KPC-2} 在大肠埃希菌中介导美罗培南低水平耐药的调控机制, 我们利用 EZ-Tn5 转座子系统构建了 EC600/p21QH43K-KPC 突变文库 (图 1)。随机选取 5 000 个突变体, 在添加 2 mg/L 美罗培南的 LB 琼脂板上筛选对美罗培南耐药表型增加的突变子。最终仅获得 1 株对美罗培南耐药性增强的突变体 EC600/p21QH43K-KPC-130 (MIC=8.000 mg/L) (表 3), 突变子对碳青霉烯类药物美罗培南、亚胺培南和厄他培南均呈现中等强度的耐药水平, 且与 EC600/p21QH43K-KPC 相比, 对美罗培南、亚胺培南和厄他培南的 MIC 分别增加了 63、7 和 15 倍。通过对

EC600/p21QH43K-KPC-130 和 EC600/p21QH43K-KPC 进行 WGS 和序列比对分析发现, 突变子的染色体基因 *ompR* (全局转录调控因子) 中存在 EZ-Tn5 转座子插入, 同时还发现染色体基因 *iron* [编码 Fe(III) 指示转运系统渗透酶蛋白] 和质粒基因 *ltrA* (编码逆转录型 RNA 定向 DNA 聚合酶, 即细菌逆转录酶) 存在非同义的单核苷酸突变。

2.2 *ompR* 基因缺失增加 *bla*_{KPC-2} 介导的碳青霉烯类药物耐药水平

为了确定 *ompR*、*ltrA* 和 *iron* 基因是否影响大肠埃希菌 EC600/p21QH43K-KPC 对碳青霉烯类药物的耐药水平, 我们在 EC600/p21QH43K-KPC 和

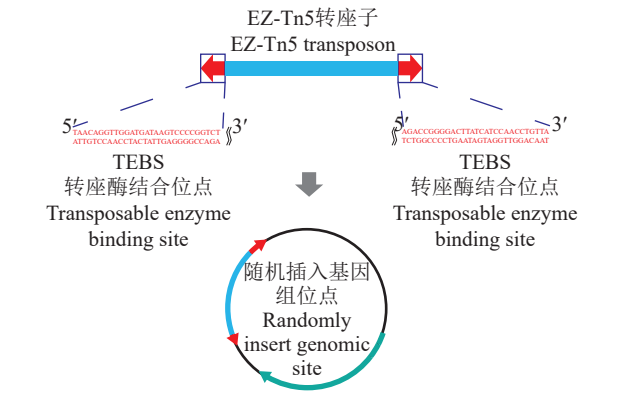


图 1 基于转座子突变文库筛选目标基因

Fig. 1 Screening of the target gene based on transposon mutation library

EC600 中构建了 *ltrA*、*ompR* 和 *iron* 基因缺失菌株。如表 4 所示, 发现 *ompR* 缺失菌株 EC600Δ*ompR*/p21QH43K-KPC 对碳青霉烯类药物美罗培南、亚胺培南和厄他培南均呈现中/高等强度的耐药水平, 与菌株 EC600/p21QH43K-KPC 相比, 即使 *ompR* 基因缺失轻微抑制了 EC600Δ*ompR*/p21QH43K-

KPC 的生长 (数据未展示), 对美罗培南、亚胺培南和厄他培南的 MIC 分别增加 63、31 和 127 倍。通过回补试验发现, *ompR* 基因缺失的回补菌株 EC600Δ*ompR*::*ompR*/p21QH43K-KPC 可以部分恢复对碳青霉烯类药物的耐药水平。值得注意的是, 在大肠埃希菌菌株 EC600 中, *ompR* 缺失对美罗培南和厄他培南的 MIC 呈现轻微增加, 分别增加 3 和 7 倍。我们进一步检测了 EC600Δ*ompR*/p21QH43K-KPC 对其他种类抗菌药的耐药表型, 与 EC600/p21QH43K-KPC 相比, *ompR* 缺失导致对环丙沙星、头孢西丁和头孢他啶的 MIC 增加 3 倍 (表 5)。其次, 相比之下, *ltrA* 和 *iron* 基因敲除菌均未改变菌株 EC600/p21QH43K 和 EC600 对美罗培南、亚胺培南和厄他培南的 MIC。这些数据表明, *ompR* 基因缺失导致 *bla*_{KPC-2} 基因在菌株 EC600Δ*ompR*/p21QH43K-KPC 中介导对碳青霉烯类药物耐药水平大幅度增加, 达到中高等水平耐药。

表 4 *ompR*、*iron* 和 *ltrA* 基因缺失后大肠埃希菌对受试抗菌药的耐药性

Table 4 Resistance of *Escherichia coli* to the tested drugs after the deletion of the *ompR*, *iron* and *ltrA* genes

菌株 Strain	最小抑菌浓度/(mg·L ⁻¹) Minimal inhibitory concentration		
	美罗培南 Meropenem	亚胺培南 Imipenem	厄他培南 Ertapenem
EC600/p21QH43K-KPC	0.125	0.500	0.250
EC600Δ <i>ompR</i> /p21QH43K-KPC	8.000	16.000	32.000
EC600Δ <i>ompR</i> :: <i>ompR</i> /p21QH43K-KPC	1.000	0.250	0.500
EC600	0.016	0.125	0.008
EC600Δ <i>ompR</i>	0.064	0.125	0.064
EC600Δ <i>iron</i> /p21QH43K-KPC	0.250	0.500	0.250
EC600Δ <i>ltrA</i> /p21QH43K-KPC	0.125	0.500	0.250

表 5 *ompR* 基因缺失后大肠埃希菌对受试抗菌药的耐药性¹⁾

Table 5 Resistance of *Escherichia coli* to the tested drugs after the deletion of the *ompR* gene

菌株 Strain	最小抑菌浓度/(mg·L ⁻¹) Minimal inhibitory concentration								
	FOS	AMK	CTX	FOX	AMP	CAZ	TET	ATM	CIP
EC600/p21QH43K-KPC	256	>256	16	16	>256	64	1	16	0.032
EC600Δ <i>ompR</i> /p21QH43K-KPC	8	>256	16	64	>256	256	1	32	0.125
EC600Δ <i>ompR</i> :: <i>ompR</i> /p21QH43K-KPC	>256	>256	32	64	>256	128	1	64	0.125

1) FOS: 磷霉素, AMK: 阿米卡星, CTX: 头孢噻肟, FOX: 头孢西丁, AMP: 氨苄西林, CAZ: 头孢他啶, TET: 四环素, ATM: 氨曲南, CIP: 环丙沙星。

1) FOS: Fosfomycin, AMK: Amikacin, CTX: Cefotaxime, FOX: Cefoxetine, AMP: Ampicillin, CAZ: Ceftazidime, TET: Tetracycline, ATM: Aztreonam, CIP: Ciprofloxacin.

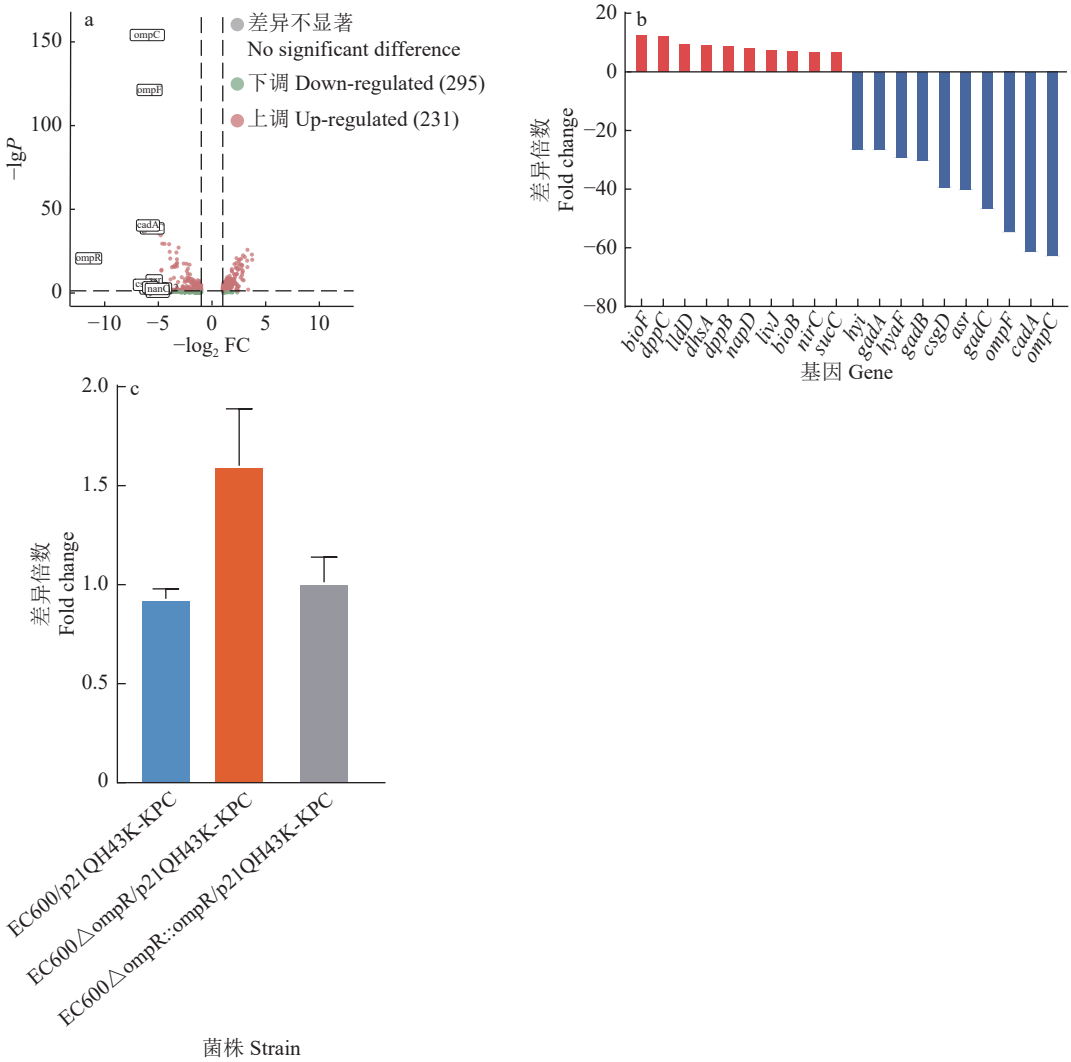
2.3 *ompR* 缺失影响大肠埃希菌 EC600/p21QH43K-KPC 转录组谱

考虑 *ompR* 基因是全局转录调控因子, 我们进而探究了 *ompR* 缺失对大肠埃希菌 EC600/p21QH43K-

KPC 转录组谱的影响。转录组测序结果分析显示, 与大肠埃希菌 EC600/p21QH43K-KPC 相比, EC600Δ*ompR*/p21QH43K-KPC 在转录水平上存在明显差异, 有 526 个基因存在显著差异表达, 其中

231 个基因显著上调, 295 个基因显著下调, 说明敲除 *ompR* 基因对大肠埃希菌 EC600/p21QH43K-KPC 转录组谱产生了影响 (图 2a)。通过对差异表达基因进行 GO 分类分析, 各类均分析排名前十的生物学过程, 在生物学过程 (Biological process, BP) 部分, 主要参与跨膜运输、呼吸电子传递链、电子传递链、氢离子跨膜运输、有/无氧呼吸等。在细胞组成 (Cellular component, CC) 部分, 主要分布在细胞膜及胞内细胞器。在分子功能 (Molecular function, MF) 部分, 基因主要富集在蛋白结合、氧化还原酶、跨膜转运蛋白、铁离子结合蛋白、血红素结合蛋白、NADH 脱氢酶活性等通路。将差异显著基因进一步进行 KEGG 分析, 差异基因主要富集在不同环境中的氧化磷酸化、TCA 循环、ABC 转运、

群体感应及铁载体群非核糖体肽的生物合成相关通路。此外, 氨基酸代谢相关基因 (*nspD*、*nirC*、*dppC*、*dppB*、*livJ* 和 *bhsA*) 和呼吸链相关基因 (*bioF*、*lldD*、*bioB*和 *sucC*) 的 mRNA 水平上调较为明显, 为 6.50~12.40 倍, 而调控因子 (*csgD*、*gadA*、*gadB* 和 *gadC*)、膜蛋白相关基因 (*yhiM*、*ompC*、*ompF*、*asr*)、糖酵解基因 (*hyi*) 和生物胺合成基因 (*cadA*) mRNA 水平下降较为明显, 为 26.20~62.52 倍 (图 2b), 其中 *ompC* 和 *ompF* 基因的转录表达水平分别下调 62.52 和 54.38 倍。然而值得注意的是, 转录组测序结果显示 *ompR* 基因缺失对 *bla*_{KPC-2} 基因的 mRNA 水平无明显影响, 这一结果也进一步通过 RT-qPCR 得到验证 (图 2c)。



a: 差异表达基因火山图, 由 *t* 检验确定相对于 EC600/p21QH43K 菌株的差异显著性; b: 上调和下调的 Top 10 显著差异表达基因; c: 采用 RT-qPCR 检测 *bla*_{KPC-2} 的转录本水平, 该基因在 EC600/p21QH43K 菌株中的转录水平设为 1, 误差条表示 3 个独立试验的标准差。
a: Volcano map of differentially expressed genes, the significance of the difference relative to the EC600/p21QH43K strain was determined by *t*-test; b: Top 10 up- and down-regulated significantly differentially expressed genes; c: The transcript levels of *bla*_{KPC-2} determined by RT-qPCR, the transcriptional level of this gene in the EC600/p21QH43K strain was set as 1, and the error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

图 2 *ompR* 缺失对大肠埃希菌 EC600/p21QH43K-KPC 转录组谱的影响
Fig. 2 Effect of *ompR* deletion on the transcriptome profile in stain EC600/p21QH43K-KPC

考虑到外膜孔蛋白 (OMPs) 是革兰阴性菌的独特结构, 它形成亲水性开放通道, 允许小分子量的亲水性抗生素扩散到细胞中^[18-19]。*ompR* 缺失导致下调的 OMP 相关的基因 *ompC* 和 *ompF* 可能是导致细菌耐药性异常的原因之一。因此, 我们进一步研究了 *ompC* 和 *ompF* 基因的缺失是否影响大肠埃希菌 EC600/ p21QH43K-KPC 对碳青霉烯类药物的耐药水平。结果发现与 EC600/p21QH43K-KPC 相比, *ompC/ompF* 基因缺失菌株 EC600Δ*ompC*/p21QH43K-KPC 和 EC600Δ*ompF*/p21QH43K-KPC 对碳青霉烯类药物的 MIC 升高 1~3 倍 (表 6),

但仍低于 *ompR* 基因缺失菌株 EC600Δ*ompR*/p21QH43K-KPC 对碳青霉烯类药物的 MIC。*ompC* 和 *ompF* 基因缺失导致大肠埃希菌 EC600 菌株对碳青霉烯类药物的 MIC 几乎无明显影响。这些结果表明尽管 *ompR* 基因缺失导致 *ompC* 和 *ompF* 转录表达水平大幅度上调, 但其对 *ompR* 基因缺失引起菌株 EC600/p21QH43K-KPC 对碳青霉烯类药物呈现的中高水平耐药贡献较低。这暗示了 *ompR* 基因缺失导致 *bla*_{KPC-2} 基因在菌株 EC600Δ*ompR*/p21QH43K-KPC 中介导对碳青霉烯类药物耐药水平大幅度增加的调控机制仍有待进一步研究。

表 6 *ompC/ompF* 基因缺失后大肠埃希菌对碳青霉烯类药物的耐药性
Table 6 Carbapenems resistance of *Escherichia coli* after the deletion of the *ompC/ompF* gene

菌株 Strain	最小抑菌浓度/(mg·L ⁻¹) Minimal inhibitory concentration		
	美罗培南 Meropenem	亚胺培南 Imipenem	厄他培南 Ertapenem
EC600/pQH43K-KPC	0.125	0.500	0.250
EC600Δ <i>ompC</i> /p21QH43K-KPC	0.500	1.000	0.500
EC600Δ <i>ompF</i> /p21QH43K-KPC	0.500	1.000	0.500
EC600	0.016	0.125	0.008
EC600Δ <i>ompC</i>	0.016	0.064	0.008
EC600Δ <i>ompF</i>	0.016	0.250	0.008

3 讨论与结论

耐碳青霉烯类肠杆菌科的出现和传播对公众健康构成严重威胁^[20]。尽管产碳青霉烯酶是导致菌株对碳青霉烯类药物耐药的重要机制, 但携带同一种碳青霉烯酶基因在不同菌种、甚至同一菌种不同菌株中介导的碳青霉烯类药物耐药水平往往存在差异。因而, 肠杆菌科细菌中碳青霉烯酶基因调控的分子机制有待进一步研究。本研究中, 我们发现大肠埃希菌染色体中全局调控因子 OmpR 参与调控 IncFII 质粒 p21QH43K-KPC 编码的 *bla*_{KPC-2} 基因介导碳青霉烯类药物低水平耐药。这一结果一定程度上解释了携带 *bla*_{KPC-2} 质粒转移至大肠埃希菌后介导碳青霉烯类药物低水平耐药的原因。

我们通过构建大肠埃希菌 EC600/p21QH43K-KPC 突变文库并结合基因敲除技术, 将染色体基因 *ompR* 与质粒编码基因 *bla*_{KPC-2} 介导的碳青霉烯类药物低水平耐药相联系。OmpR 是一种 DNA 结合蛋白, 可被激酶 EnvZ 磷酸化, EnvZ-OmpR 双组分系统参与协调细菌对环境因素刺激的转录反应, 包括渗透压应激、对生长条件的反应^[21]、运动性^[22]、细胞内存活能力^[23]、毒力^[24] 以及抗生素耐药性^[25]。

先前的研究表明, OmpR 通过调节 *ompC* 和 *ompF* 的外膜孔蛋白基因影响对抗生素耐药性, 其作用于胞膜通透性以限制细胞内抗生素的进入^[26]。事实上, 我们也发现 *ompC/ompF* 基因缺失导致菌株 EC600/p21QH43K-KPC 对碳青霉烯类药物耐药水平略有增加, 尽管在转录水平上 *ompR* 基因的缺失显著降低了 *ompC* 和 *ompF* 的表达量。这暗示 *ompR* 基因缺失导致 *bla*_{KPC-2} 基因在菌株 EC600Δ*ompR*/p21QH43K-KPC 中介导对碳青霉烯类药物的中高耐药水平, 似乎与 *ompR* 对 *ompC* 和 *ompF* 的调节关系较小。鉴于 OmpR 为转录调控因子, 我们进一步探究了 *ompR* 是否会调控 *bla*_{KPC-2} 基因的转录表达。然而, 转录组测序以及 RT-qPCR 检测均表明 *ompR* 基因缺失对 *bla*_{KPC-2} 基因的 mRNA 水平无明显影响。考虑到 *ompR* 缺失影响了大肠埃希菌 EC600/p21QH43K-KPC 转录组谱, *ompR* 参与 *bla*_{KPC-2} 基因的调控机制较为复杂。*ompR* 缺失是如何导致 *bla*_{KPC-2} 基因在菌株 EC600Δ*ompR*/p21QH43K-KPC 中介导对碳青霉烯类药物的耐药水平大幅度增加仍有待进一步探究。

前期细菌耐药性调查研究表明, *bla*_{KPC-2} 基因具有较强的细菌宿主偏好性, 其主要的宿主菌为

ST11 CRKP, 而在大肠埃希菌中该基因的流行率较低^[27]。最近的一项全国性碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌监测研究也发现, 76.5% 的 CRKP 携带 *bla*_{KPC-2}, 而大肠埃希菌中携带 *bla*_{KPC-2} 的比例仅为 3.2%^[28]。相关报道还显示产 KPC-2 的肺炎克雷伯菌菌株常常对美罗培南呈现高水平耐药, 然而, 携带 *bla*_{KPC-2} 的质粒从肺炎克雷伯菌转移至大肠埃希菌后, 常常介导美罗培南低水平耐药^[7-9]。考虑到在碳青霉烯耐药性调查中, 研究者常用添加 1 或 2 mg/L 美罗培南的麦康凯琼脂板筛选碳青霉烯耐药菌^[29], 进而筛选碳青霉烯耐药基因, 包括 *bla*_{KPC-2}。这暗示 *bla*_{KPC-2} 在大肠埃希菌中的真实流行率可能被低估了。另一方面, 这也表明转录调控因子 *OmpR* 可能在碳青霉烯药物选择压力下, 抵御 *bla*_{KPC-2} 在大肠埃希菌中的传播, 而 *ompR* 的基因缺失或突变可能是逃避这种作用的关键因素。

综上所述, 我们发现耐美罗培南肺炎克雷伯菌 IncFII 质粒 p21QH43K-KPC 编码的 *bla*_{KPC-2} 基因在大肠埃希菌中介导碳青霉烯类药物的低水平耐药, 这与转录调控因子 *OmpR* 对 *bla*_{KPC-2} 基因的调控有关。我们的结果为解析大肠埃希菌染色体转录调控因子 *OmpR* 参与调控质粒编码的碳青霉烯酶基因提供了重要的见解。

参考文献:

[1] TIAN F B, LI Y, WANG Y, et al. Risk factors and molecular epidemiology of fecal carriage of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in patients with liver disease[J]. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2023, 22(1): 10.

[2] 范向平, 谢琪, 刘志云, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌感染患者临床分布特点、耐药基因及相关危险因素分析[J]. *临床误诊误治*, 2024, 37(21): 39-47.

[3] BAI S C, FANG L X, XIAO H L, et al. Genomics analysis of KPC-2 and NDM-5-producing Enterobacteriaceae in migratory birds from Qinghai Lake, China[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(24): 7531-7542.

[4] LI X, LI C G, ZHOU L J, et al. Global phylogeography and genomic characterization of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}-positive clinical *Klebsiella aerogenes* isolates from China, 2016-2022[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 923: 171560.

[5] FURLAN J P R, LOPES R, RAMOS M S, et al. The detection of KPC-2, NDM-1, and VIM-2 carbapenemases in international clones isolated from fresh vegetables

highlights an emerging food safety issue[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 420: 110765.

[6] TANG M L, LI J, LIU Z J, et al. Clonal transmission of polymyxin B-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates coharboring *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC-2} in a tertiary hospital in China[J]. *BMC Microbiology*, 2023, 23(1): 64.

[7] LIU H, LIN H, SUN Z W, et al. Distribution of β -lactamase genes and genetic context of *bla*_{KPC-2} in clinical carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2021, 14: 237-247.

[8] NAHA S, SANDS K, MUKHERJEE S, et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 in a neonatal unit: Clonal isolates with differences in colistin susceptibility attributed to AcrAB-TolC pump[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, 55(3): 105903.

[9] SU S S, LI C J, ZHAO Y, et al. Outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST76 isolates in an intensive care unit and neurosurgery unit[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2020, 26(9): 1009-1018.

[10] WANG J, YAO X, LUO J, et al. Emergence of *Escherichia coli* co-producing NDM-1 and KPC-2 carbapenemases from a retail vegetable, China[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, 73(1): 252-254.

[11] HAO J C, ZHANG B Q, DENG J M, et al. Emergence of a hypervirulent tigecycline-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain co-producing *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC-2} with an uncommon sequence type ST464 in Southwestern China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 868705.

[12] HUANG L J, FU L, HU X Y, et al. Co-occurrence of *Klebsiella variicola* and *Klebsiella pneumoniae* both carrying *bla*_{KPC} from a respiratory intensive care unit patient[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2021, 14: 4503-4510.

[13] SEKIZUKA T, INAMINE Y, SEGAWA T, et al. Potential KPC-2 carbapenemase reservoir of environmental *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolates from the effluent of an urban wastewater treatment plant in Japan[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2019, 11(4): 589-597.

[14] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 33th ed. CLSI supplement M100[EB/OL]. Wayne, PA: CLSI, 2023. https://clsi.org/all-free-resources/.

[15] DOS S C J, DOS S P B, DE S A T H I, et al. KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wild animals in Brazil[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2023, 54(4): 3307-3313.

- [16] HE Y Z, XU Y, SUN J, et al. Novel plasmid-borne fimbriae-associated gene cluster participates in biofilm formation in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2021, 27(12): 1624-1632.
- [17] WANG L J, HUANG X T, JIN Q, et al. Two-component response regulator ompR regulates mucoviscosity through energy metabolism in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(3): e0054423.
- [18] PAGÈS J M, JAMES C E, WINTERHALTER M. The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in gram-negative bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(12): 893-903.
- [19] VERGALLI J, BODRENKO I V, MASI M, et al. Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of gram-negative bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(3): 164-176.
- [20] WANG Y Y, XU E E, LI M, et al. Genomic characterization of hypervirulent carbapenem-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolate from China[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2022, 30: 276-278.
- [21] QIN L, YOSHIDA T, INOUE M. The critical role of DNA in the equilibrium between OmpR and phosphorylated OmpR mediated by EnvZ in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(3): 908-913.
- [22] PRÜß B M. Involvement of two-component signaling on bacterial motility and biofilm development[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(18): e00259-17.
- [23] DU Z Y, ZHANG M M, QIN Y X, et al. The role and mechanisms of the two-component system EnvZ/OmpR on the intracellular survival of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2022, 45(11): 1609-1621.
- [24] TIPTON K A, RATHER P N. An ompR-envZ two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(3): e00705-16.
- [25] KO D, CHOI S H. Mechanistic understanding of antibiotic resistance mediated by EnvZ/OmpR two-component system in *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2022, 77(9): 2419-2428.
- [26] WANG M, TIAN Y J, XU L, et al. High osmotic stress increases OmpK36 expression through the regulation of KbvR to decrease the antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(3): e0050722.
- [27] TANG Y, LI G, SHEN P H, et al. Replicative transposition contributes to the evolution and dissemination of KPC-2-producing plasmid in *Enterobacteriales*[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 113-122.
- [28] WANG Q, WANG X J, WANG J, et al. Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Data from a longitudinal large-scale CRE study in China (2012-2016)[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2018, 67(suppl_2): S196-S205.
- [29] LV L C, LU Y Y, GAO X, et al. Characterization of NDM-5-producing *Enterobacteriaceae* isolates from re-tail grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and evidence of *bla*_{NDM-5}-bearing IncHI2 plasmid transfer between ducks and fish[J]. *Zoological Research*, 2022, 43(2): 255-264.

【责任编辑 庄 延】