

# 低能 N<sup>+</sup> 注入诱导大肠杆菌的 16S rRNA 遗传进化

唐朝<sup>1</sup> 王婷<sup>2</sup> 王雪瑞<sup>1</sup> 陈明晖<sup>3</sup> 蔡长龙<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(西安工业大学光电工程学院 西安 710021)

<sup>2</sup>(陕西科技大学食品与生物工程学院 西安 710021)

<sup>3</sup>(中国北方车辆研究所 北京 100072)

**摘要** 为了探究低能 N<sup>+</sup> 注入对大肠杆菌 16S rRNA 遗传进化与耐药表征的作用, 本研究利用低能 N<sup>+</sup> 注入诱变筛选耐药大肠杆菌, 通过基因组 *de novo* 测序获得其 16S rRNA 基因序列, 通过 K-B 法检测诱变菌株的耐药特征。结果共诱变获得了 25 株耐药菌株, 其中 5 株诱变菌 16S rRNA 基因分别出现片段缺失, 点突变 (A257C), GC% 含量增高, 二级结构变异, 并获得多药耐药特性。结果提示: 低能 N<sup>+</sup> 注入可以驱动大肠杆菌 16S rRNA 基因的随机突变和进化, 进而调节耐药基因从头合成或变异, 使大肠杆菌耐药性改变。

**关键词** 低能 N<sup>+</sup> 注入, 大肠杆菌, 16S rRNA, 耐药性

**中图分类号** Q933

**DOI:** 10.11889/j.1000-3436.2023-0084

**引用该文:**

唐朝, 王婷, 王雪瑞, 等. 低能 N<sup>+</sup> 注入诱导大肠杆菌的 16S rRNA 遗传进化[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2024, 42(1): 010301. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2023-0084.

TANG Chao, WANG Ting, WANG Xuerui, *et al.* Genetic evolution of 16S rRNA in *Escherichia coli* induced by low-energy N<sup>+</sup> implantation[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2024, 42(1): 010301. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2023-0084.



## Genetic evolution of 16S rRNA in *Escherichia coli* induced by low-energy N<sup>+</sup> implantation

TANG Chao<sup>1</sup> WANG Ting<sup>2</sup> WANG Xuerui<sup>1</sup> CHEN Minghui<sup>3</sup> CAI Changlong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(School of Optoelectronic Engineering, Xi'an University of Technology, Xi'an 710021, China)

<sup>2</sup>(College of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

<sup>3</sup>(China Northern Vehicle Research Institute, Beijing 100072, China)

**ABSTRACT** To further understand the role of low-energy N<sup>+</sup> implantation in the phylogenetic evolution and characterization of drug resistance in *Escherichia coli* (*E. coli*), this study used low-energy N<sup>+</sup> ion implantation to screen for drug resistant *E. coli*. The 16S rRNA gene sequences were obtained through *de novo* genome sequencing, and the drug resistance characteristics of mutant strains were assessed using the K-B method. Twenty-five drug-resistant strains were obtained by mutagenesis. The 16S rRNA in five mutant strains had a point mutation (A257C) or a gene deletion in C1, V1, V2, V6–V9, and C6–C9 regions, respectively. GC content increased and the mutation

基金资助: 国家自然科学基金项目(11975177)

第一作者: 唐朝, 男, 1992年出生, 西安工业大学博士研究生, 主要研究方向为离子束生物工程

通信作者: 蔡长龙, 教授, 主要研究方向为离子束生物工程, E-mail: changlongcai@126.com

收稿日期: 初稿 2023-10-04; 修回 2023-11-14

Supported by National Natural Science Foundation of China (11975177)

First author: TANG Chao (male) was born in 1992. Now he is a graduate student at Xi'an University of Technology, majoring in ion beam bio-engineering

Corresponding author: CAI Changlong, professor, majoring in ion beam bio-engineering. E-mail: changlongcai@126.com

Received 04 October 2023; accepted 14 November 2023

rate reached 0.4%–0.6%. The results indicate that low-energy N<sup>+</sup> ion implantation could trigger mutations and drive 16S rRNA gene evolution in *E. coli.*, which could accelerate development of antibiotic resistance in *E. coli.*

**KEYWORDS** Low-energy N<sup>+</sup> ion implantation, *Escherichia coli*, 16S rRNA, Antibiotic resistance simulation

**CLC** Q933

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是家禽、家畜及人肠道中最常见的条件致病菌之一,能够引起人体或动物胃肠道感染,尿道感染,关节炎,脑膜炎甚至败血症。近年来,在动物养殖过程中,抗生素的使用量逐年上升,导致大肠杆菌对常用抗菌药的耐药性不断攀升,传播广泛,给人体健康、畜牧养殖和食品安全带来新的挑战。有研究<sup>[1-2]</sup>发现,大肠杆菌主要通过染色体突变、耐药因子的水平转移合成抗生素水解酶,改变细菌细胞膜外排蛋白结构和数量,降低药物与靶标结合的亲和力并产生耐药性。16S rRNA基因在结构与功能上具有高度的保守性,其进化具有良好的时钟性质,是细菌系统分类研究中最常用的分子钟。16S rRNA基因序列分析也是目前微生物种属鉴定、微生物群落结构分析最常用的系统进化标记分子<sup>[3-5]</sup>。Nie等<sup>[6]</sup>使用 $\gamma$ 射线辐照诱变枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),累计剂量为0.1~1.2 kGy,获得诱变型*B. subtilis*,其16S rRNA未发生突变。Rozhko等<sup>[7]</sup>使用低剂量 $\alpha$ 射线、 $\beta$ 射线照射海洋发光细菌,其16S rRNA亦未发生突变。而课题组前期研究发现,低能离子注入介导获得的离子束重组沙漠寡营养细菌DOB073株16S rRNA基因拷贝数、基因序列出现显著变化,并出现了21个与磷霉素、青霉素及万古霉素等耐药性相关新基因<sup>[8-9]</sup>,但是低能离子注入诱变是否与大肠杆菌16S rRNA进化和耐药性发生相关,目前尚未见报道。

本研究通过注入不同剂量的低能N<sup>+</sup>诱变大肠杆菌ATCC25922获取变异菌株库,以抗性平板筛选对诺氟沙星、多粘菌素B、链霉素耐药的菌株,并通过生物信息学方法和琼脂扩散法分析诱变菌株的16S rRNA序列、耐药基因及其耐药性变异,为探索大肠杆菌的耐药性形成机制研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠杆菌ATCC-25922株,购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。诺氟沙星、多粘菌素B、链霉素,购自索莱宝生物科技有限公司; Mueller-

Hinton Broth (MH)培养基,购自OXOID公司; 抗生素药敏片,购自杭州微生物试剂有限公司。生物改性离子注入装置,西安工业大学离子束生物工程及生物多样研究中心。JC-150A生化培养箱,山东精诚仪器仪表有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 低能离子注入诱变和耐药菌株的筛选

将ATCC25922株接种MH培养基,培养至对数生长期,洗涤3次后用无菌水将菌液稀释至 $1 \times 10^9$  CFU/mL,菌悬液按照100  $\mu$ L/皿均匀涂布于培养皿中,无菌风吹干成菌膜;将菌膜置于生物改性离子注入装置靶室中,设置真空度为 $10^{-3}$  Pa,注入能量为15 keV,注入剂量为 $100 \times 10^{14}$  cm<sup>2</sup>,进行N<sup>+</sup>注入诱变;诱变后每皿菌膜加1 mL LB培养基进行复苏,以100  $\mu$ L/板将所有复苏菌液均匀涂布于MHA平板上,37  $^{\circ}$ C培养24~72 h,计算诱变存活率;诱变存活菌株分别转接含16  $\mu$ g/mL诺氟沙星(MHA-NOR<sup>+</sup>)、4  $\mu$ g/mL多粘菌素B(MHA-PB<sup>+</sup>)和32  $\mu$ g/mL链霉素(MHA-SM<sup>+</sup>)的平板,37  $^{\circ}$ C培养24~72 h,传代3次并记录平板菌落数,以获得遗传稳定的耐诺氟沙星、多粘菌素B和链霉素的大肠杆菌。

#### 1.2.2 大肠杆菌基因组测序与16S rRNA分析方法

将出发菌株ATCC25922与低能离子注入诱变获得的耐药大肠杆菌送北京诺禾致源科技股份有限公司进行全基因组测序,用Spades将*de novo*测序数据组装其基因组<sup>[10]</sup>,用RNAmmer (<http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer>)从基因组中获取所有的16S rRNA基因序列<sup>[5]</sup>,利用Clustalw (<http://www.clustal.org/clustal2>)进行所有16S rRNA基因序列的完全比对<sup>[11]</sup>,并利用MUSCLE、MrBayes、DNASTAR.Lasergene.v11 MegAlign进行序列比对分析和系统进化树绘制<sup>[12-14]</sup>。

#### 1.2.3 大肠杆菌16S rRNA的二级结构分析

利用Vienna RNA Web Services (<http://ma.tbi.univie.ac.at>)对所有低能离子注入诱变获得的耐药大肠杆菌的16S rRNA基因序列进行比对,预测保守二级结构的预测<sup>[15]</sup>,并使用软件RNAfold对16S

rRNA的9个保守区(C区)和9个可变区(V区)区域序列分别进行二级结构预测<sup>[16]</sup>, 取自由能最低的结构生成二级结构折叠图。

#### 1.2.4 大肠杆菌耐药相关基因分析

利用 Spades 软件对大肠杆菌测序数据进行拼装, 利用 blast 将预测的基因比对到抗生素抗性基因与金属抗性基因 Bacmet 数据库和抗生素抗性基因在线 SARGs 获得抗性相关基因信息<sup>[17-18]</sup>。

#### 1.2.5 大肠杆菌的耐药特征

将 16S rRNA 变异的诱变耐药大肠杆菌与出发菌株 ATCC25922 通过 K-B 琼脂扩散法, 鉴定菌株对常用抗生素药物敏感性的变化<sup>[19]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 低能 N<sup>+</sup>注入及耐药菌株的筛选

低能 N<sup>+</sup>注入诱变大肠杆菌存活率和突变率结果见表 1。

将 ATCC25922 株进行低能 N<sup>+</sup>注入诱变, 结果 3 次诱变真空对照组在 MHA 平板上共长出 39 042 个菌落, 存活率为 96.8%, 经过 3 次转印 MHA 抗性平板, 筛选获得 1 株对多粘菌素 B 耐药大肠杆菌, 阳性突变率 0.003%。而离子注入组在 MHA 平板上共长出 4 797 个突变菌落, 诱变存活率为 15.99%。经过分别转印 MHA-NOR+ 抗性平板、MHA-PB+ 抗性平板和 MHA-SM+ 抗性平板传代 3 次, 筛选获得 4 株对诺氟沙星耐药大肠杆菌(阳性突变率 0.083%); 11 株对多粘菌素 B 耐药大肠杆菌(阳性突变率 0.229%)和 10 株对链霉素耐药大肠杆菌(阳性突变率 0.208%)实验结果说明, 与真空对照组相比, 离子注入引发细胞损伤, 降低了大肠杆菌的存活率, 同时提高了菌体的突变率; 而 3 次诱变获得不同数量存活菌株和不同耐药特征耐药株, 说明低能 N<sup>+</sup>可以加速大肠杆菌耐药性的进化, 但其诱变是随机的, 非定向的。

表 1 低能 N<sup>+</sup>注入诱变大肠杆菌存活率和突变率  
Table 1 Mutation survival rate and mutation rate of antibiotic-resistant *E.coli* by N<sup>+</sup> implantation

组别 Groups	存活菌株 Survival number	存活率 / % Survival rate	耐药菌株数(突变率 / %) Number of antibiotic-resistant <i>E.coli</i> (mutation rate)		
			NOR+	PB+	SM+
1	1 728	17.28	4(0.231)	2(0.116)	0
2	1 472	14.72	0	7(0.476)	0
3	1 597	15.97	0	2(0.125)	10(0.626)
合计 Total	4 797	15.99	4(0.083)	11(0.229)	10(0.208)
对照组 Control group	39 042	96.8	0	1(0.003)	0

### 2.2 诱变耐药大肠杆菌 16S rRNA 序列分析

通过 RNAmmer 工具对离子诱变获得的 25 株对离子注入诱变获得的耐药大肠杆菌及出发菌株 ATCC25922 进行 16S rRNA 序列预测, 共获得 26 条 16S rRNA 序列。其中, ATCC25922 株 16S rRNA 序列长度 1 530 bp, 诱变耐药菌株 16S rRNA 可以分为以下 6 种类型(表 2, 图 1): (1)ATCC25922 型, 共 20 株, 其 16S rRNA 序列与 ATCC25922 株完全相同, 占诱变耐药菌株数量的 80%; (2)EC-N4 株, 16S rRNA 序列长度 1 264 bp, 第 1~266 片段缺失, 与 ATCC25922 株同源性 99.5%; (3)EC-N32 株, 16S rRNA 序列长度仅 908 bp, 第 1~86 片段和 995~1 530 片段缺失, 且 257 位点有突变(A257C), 与 ATCC25922 株同源性 99.4%; (4)EC-N35 株,

16S rRNA 序列长度 1 444 bp, 第 1~86 片段缺失, 且 257 位点有突变(A257C), 与 ATCC25922 株同源性 99.5%; (5)ECD-S34 株, 16S rRNA 序列长度 1 254 bp, 第 1 255~1 530 片段缺失, 与 ATCC25922 株同源性 99.5%; (6)ECD-P9 株, 16S rRNA 序列长度 1 459 bp, 第 1~72 片段缺失, 与 ATCC25922 株同源性 99.6%。

$\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和 X 射线, 高能离子、低能离子等辐射源, 均可作用于微生物体 DNA、蛋白质等生物大分子引起电离和激发, 使化学键断裂、分子变性。其中, 低能 N<sup>+</sup>加速后注入生物体后通过能量沉积、质量沉积、动量传递和电荷交换直接造成胞内重要的生物大分子如蛋白质被分解, 双链 DNA 的解链、断裂, 单链 DNA 和碱基的损伤, 进

而在自我修复过程部分基因会发生基因片段插入、缺失、颠换，并由此引起生物性状的改变<sup>[20]</sup>。包珊珊等<sup>[8]</sup>用低能N<sup>+</sup>注入介导外源基因转化沙漠寡营养细菌(DOB)，结果3株离子束重组菌株DOB073、DOB113、DOB981的16S rRNA基因拷

贝数增加了5个，并在C1区、V1区、V2区、V4区、V6区、V7区、V9区都出现了基因突变。说明低能N<sup>+</sup>可以加速大肠杆菌16S rRNA基因的改变，改变以基因拷贝数、片段插入或缺失和点突变随机体出现<sup>[9]</sup>。

表2 诱变耐药大肠杆菌的16S rRNA序列特征  
Table 2 Characteristics of 16S rRNA gene in antibiotic-resistant *E.coli* by N<sup>+</sup> ion implantation

组别 Groups	长度 / bp Length	同源性 / % Homology	耐药菌株比例 / % Proportion of antibiotic-resistant <i>E.coli</i>	NOR+株比例 / % Proportion of NOR+	PB+株比例 / % Proportion of PB+	SM+株比例 / % Proportion of SM+
ATCC25922	1 530	100	80 (20/25)	4(1/25)	40(10/25)	36(9/25)
EC-N4	1 264	99.5	4(1/25)	4(1/25)	0	0
EC-N32	908	99.4	4(1/25)	4(1/25)	0	0
EC-N35	1 444	99.5	4(1/25)	4(1/25)	0	0
ECD-S34	1 254	99.5	4(1/25)	0	0	4(1/25)
ECD-P9	1 459	99.6	4(1/25)	0	4(1/25)	0

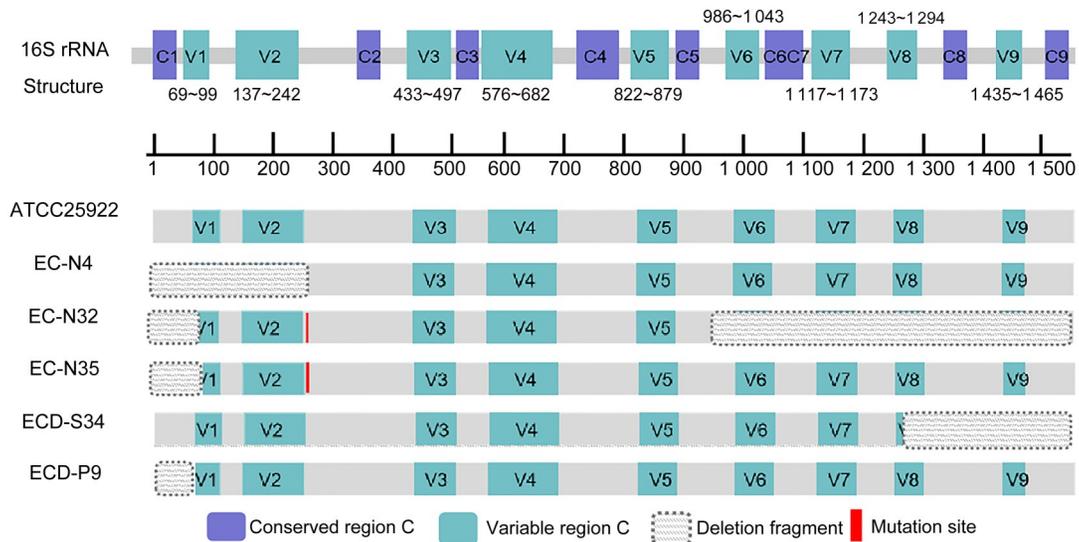


图1 诱变耐药大肠杆菌的16S rRNA序列特征  
Fig. 1 Structure of 16S rRNA gene in antibiotic-resistant *E.coli* by N<sup>+</sup> ion implantation

### 2.3 诱变耐药大肠杆菌16S rRNA序列GC含量分析

对预测得到的16S rRNA序列的碱基组成进行分析，发现出发菌株ATCC25922株的GC含量为54.71%，诱变耐药菌株的16S rRNA基因的GC含量均表现增加趋势，尤其EC-N32菌株，T%下降，C%和GC%显著上升。其原因可能是低能离子通过动量传递和电荷交换使菌体16S rRNA基因分子突变(G>T)<sup>[20]</sup>，也可能在注入后基因重组和修复过程中出现GC偏向性基因转换(gBGC)，从而增加DNA中的GC含量<sup>[21]</sup>。

表3 诱变耐药大肠杆菌16S rRNA序列GC含量  
Table 3 GC% analysis of 16S rRNA gene of antibiotic-resistant *E.coli* by N<sup>+</sup> ion implantation

类别 Groups	A%	T%	C%	G%	CG%
ATCC25922	25.10	20.20	31.83	22.88	54.71
EC-N4	25.00	20.17	31.57	23.26	54.83
EC-N32	25.00	19.38	32.93	22.69	55.62
EC-N35	24.93	20.08	31.99	22.99	54.99
ECD-S34	25.28	19.86	32.30	22.57	54.86
ECD-P9	24.81	20.29	31.94	22.96	54.90

### 2.4 诱变耐药大肠杆菌系统进化分析

以出发菌株 ATCC25922 和 NCBI 下载的其他大肠杆菌 ATCC 参考株 16S rRNA 基因序列为对照, 对 16S rRNA 序列有变化的 5 株诱变耐药菌株进行系统进化分析。结果表明, 诱变菌株 ECD-P9 与

ATCC25922 高度一致, 均为同一物种簇, 其他诱变耐药菌株同源性由高到低分别为 EC-N4、ECD-S34、EC-N35、EC-N32, 且与大肠杆菌参考株同源性均高于 99%。说明低能  $N^+$  离子注入诱变大肠杆菌 16S rRNA 基因发生片段缺失, 但未出现显著的跨种属进化特征。

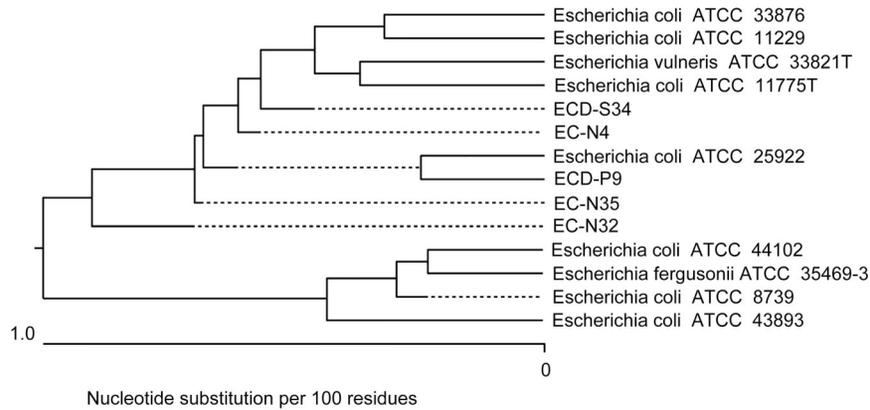


图2 诱变耐药大肠杆菌系统进化分析  
Fig.2 Phylogenetic tree of antibiotic-resistant *E.coli* by  $N^+$  implantation

### 2.5 诱变耐药大肠杆菌 16S rRNA 的二级结构分析

使用软件 RNAFOLD 对诱变耐药大肠杆菌的 16S rRNA 的 C 区和 V 区序列分别进行二级结构预测, 结果见图 3。除了 EC-N4 株的 C1、V1、C2 和

V2 区缺失, EC-N32 株的 C1、V6~C9 区缺失, ECD-S34 株的 V8、C8、V9 和 C9 区缺失, 所有诱变耐药大肠杆菌和 ATCC25922 株的 C2、C4、C6、C7、V2、V3、V6、V7 和 V9 区二级结构保守无变化。

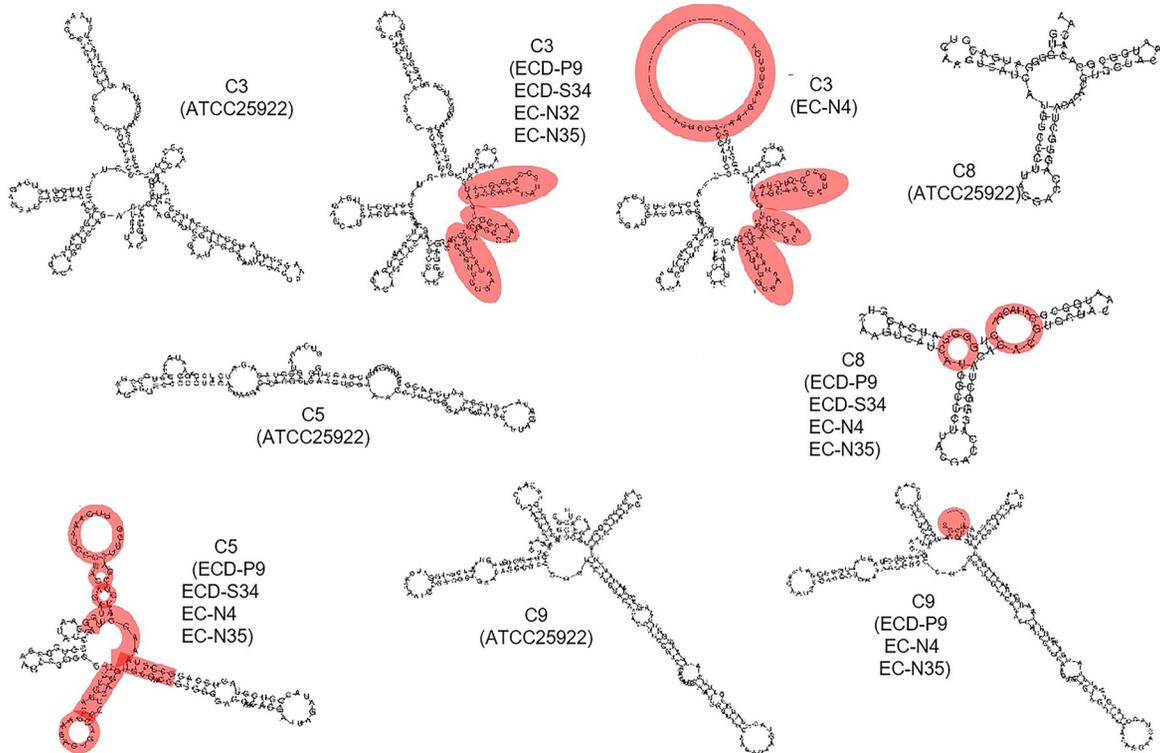


图3 诱变耐药大肠杆菌 16S rRNA 恒定区二级结构差异分析  
Fig.3 Prediction of 2D structure of C region of antibiotic-resistant *E.coli* by  $N^+$  implantation

除了EC-N4株的C1、V1、C2和V2区缺失，EC-N32株的C1、V6~C9区缺失，ECD-S34株的V8、C8、V9和C9区缺失，所有诱变耐药大肠杆菌和ATCC25922株的C2、C4、C6、C7、V2、V3、V6、V7和V9区二级结构保守无变化。与ATCC25922株相比，ECD-P9株、ECD-S34株和EC-N35株的C3区右侧长茎环结构转化为3分支环；C5区茎区的碱基数量和结构、内环碱基数量和结构大小均显著变化；C8区中央内环置换为2个小环。EC-N4株除了C3区右侧长茎环转化为3分支环，还出现上端茎区缩短，1个内环和突环变为未配对卷曲。ECD-P9株、EC-N4株和EC-N35株的C9区中央2个小发夹环解离为未配对卷曲。

进一步对菌株16S rRNA的V区序列进行二级

结构预测，结果如图4所示，ECD-P9株、EC-N4株和EC-N35株的V4区结构未变，第三个内环有碱基突变(G>A)；V5区茎区的碱基数量、内环数量和大小均显著变化；V8区1个突环变为2个内环，且未配对卷曲的碱基数量和组成也显著变化。除此以外，ECD-P9株的V1区有一个碱基缺失；EC-N32株和EC-N35株V1区碱基缺失较多，失去1个发夹环。16S rRNA是核糖体重要组成部分，其二级结构与蛋白质合成，生物进化密切相关。诱变耐药菌株的16S rRNA二级结构分析表明，与出发菌株相比，诱变耐药菌株的16S rRNA的C3、C5、C8、V4、V5、V8出现一些共有的二级结构变异，证实低能离子注入确实能驱动大肠杆菌16S rRNA高级结构的生物进化。

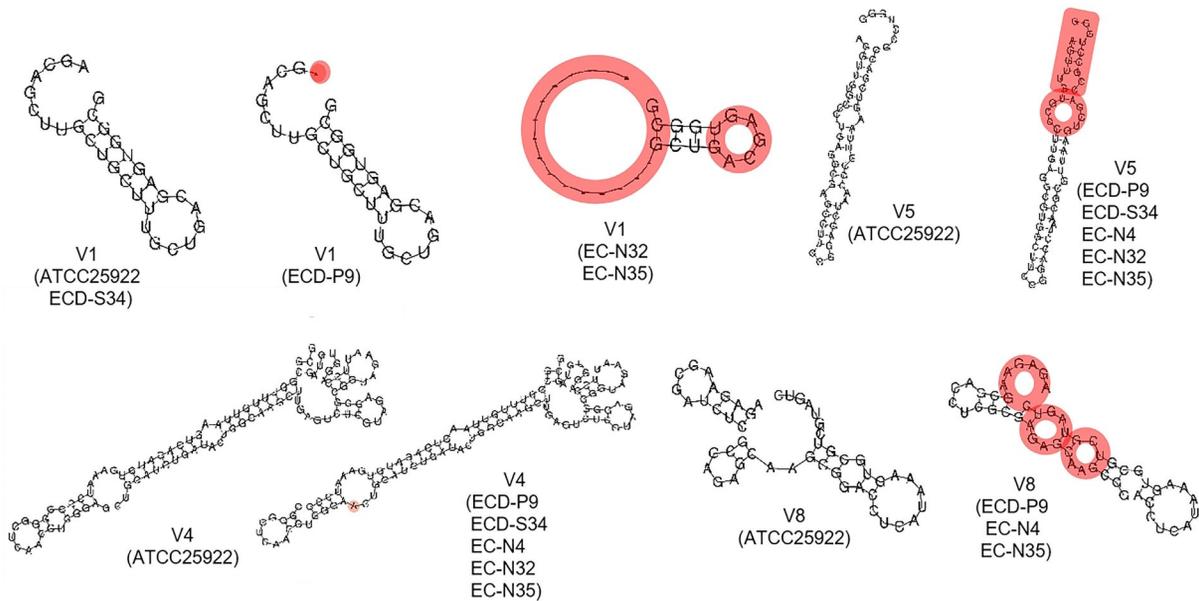


图4 诱变耐药大肠杆菌16S rRNA可变区二级结构差异分析  
Fig.4 Prediction of 2D structure of V region of antibiotic-resistant *E.coli* by N<sup>+</sup> implantation

## 2.6 诱变耐药大肠杆菌耐药基因变化

利用blast将预测的耐药大肠杆菌基因比对到Bacmet数据库和SARGs数据库，结果发现，ATCC25922菌株注释得到48个抗生素耐药基因(ARGs)，离子注入诱变获得的耐药大肠杆菌ECD-P9、EC-N4株、EC-N32株、EC-N35株和ECD-S34株分别注释得到54个、31个、17个、22个和8个ARGs。进一步对比分析发现，诱变耐药菌株与ATCC25922菌株共有4个ARGs，包括多药

耐药基因 *acrB*、*mdtA*、*mdtC* 和 *multidrug transporter* 基因；3株诺氟沙星耐药菌株EC-N4株、EC-N32株与EC-N35株共有17个ARGs，与ATCC25922菌株对比，新增了氨基糖苷类抗性基因 *aac(3)-II* 和 *aph(6)-I*、 $\beta$ -内酰胺类抗性基因 *OXA-9*，喹诺酮类药物外排基因 *norA* 和四环素抗性基因 *tetB*。ECD-P9株与ATCC25922菌株共有44个ARGs，新增了 $\beta$ -内酰胺类抗性基因 *OXA-9*、*fntC*，磷霉素抗性基因 *fosB*，多药耐药基因 *mepA* 和 major facilitator superfamily transporter 基因，喹

喹诺酮类药物外排基因 *norA* 和 *norB*, 四环素抗性基因 *tet34* 和 *tetB* 和双组分调控因子 *ArlR* 基因。EC-N4 株与 ATCC25922 菌株共有 14 个 ARGs, 新增了氨基糖苷类抗性基因 *aac(3)-II*、*aadA*、*aph(3'')-I*、*aph(6)-I* 和 *rmtB*,  $\beta$ -内酰胺类抗性基因 *CTX-M*、*OXA-9*、*PBP-1A* 和 *PBP-1B*, 大环内酯抗性基因

*ermB*, 喹诺酮类抗性基因 *norA* 和 *qepA*, 磺酰胺抗性基因 *sul1* 和 *sul2*, 四环素抗性基因 *tet34*、*tetB* 和 *tetC*。说明与出发菌株 ATCC25922 对比, 诱变耐药菌株在 16S rRNA 变异同时, 其抗生素耐药基因 (ARGs) 的种类出现不同程度变异, 丰度也发生改变, 进而影响诱变菌株的耐药性。

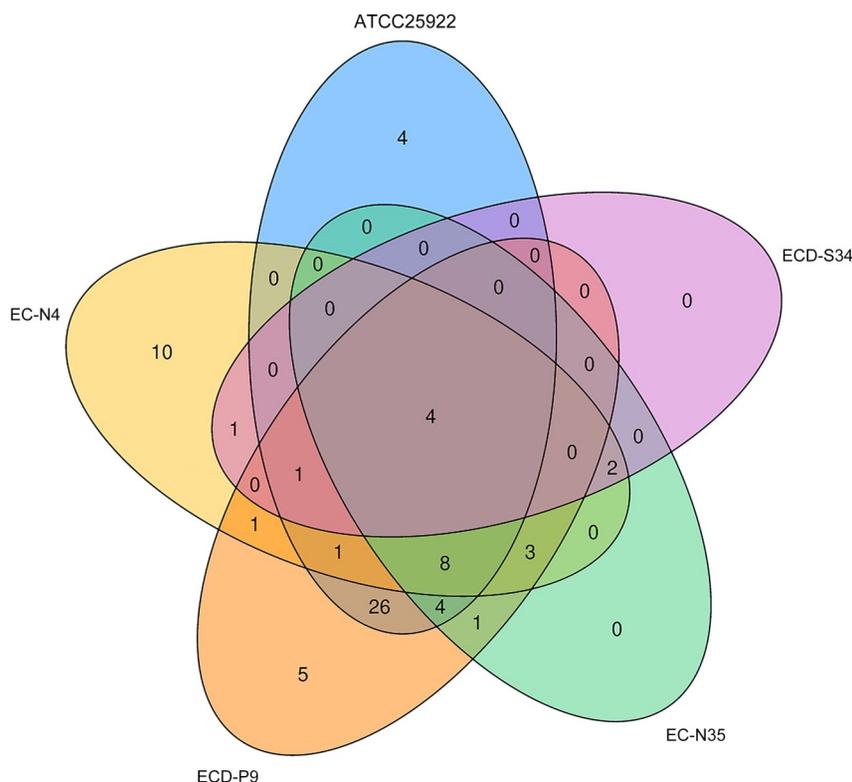


图5 诱变耐药大肠杆菌的耐药基因 Venn 分析  
Fig. 5 Venn analysis of antibiotic-resistant genes in antibiotic-resistant *E. coli*

## 2.7 16S rRNA 变异菌株耐药性分析

K-B 琼脂扩散实验结果表明, 出发菌株 ATCC25922 对  $\beta$  内酰胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类、四环素类、硝基呋喃、多粘菌素 B 等常见的 20 种抗生素均敏感。离子注入诱变耐药菌株中 EC-N4、EC-N32、EC-N35 均获得了对喹诺酮类诺氟沙星 (NOR)、环丙沙星 (CIP)、氧氟沙星 (OFX) 和左氧氟沙星 (LEV) 的耐药性, 同时 EC-N4 株还获得了对氨基糖苷类卡那霉素 (K)、丁胺卡那 (AK)、庆大霉素 (GM),  $\beta$  内酰胺类头孢曲松 (CTR)、头孢他啶 (CAZ)、头孢呋辛 (CFM)、头孢唑啉 (CZ)、羧苄西林 (CB)、氨苄西林 (AM)、四环素类四环素 (TE)、米诺环素 (MI)、多西环素 (DX), 以及氯霉素 (C) 等 6 类 17 种抗生素的耐药特性; EC-N32 株还获得了对 PB、GM、CTR、CAZ、CFM、CZ、

CB、AM、TE、MI 等 5 类 14 种抗生素的耐药特性; EC-N35 株还获得了对 GM、CTR、CB、AM、TE 等 4 类 9 种抗生素的耐药特性; ECD-S34 获得对 K、GM 和 CIP 的耐药性; ECD-P9 对 PB 的耐药性。

李艳芬<sup>[22]</sup>和 Mnich 等<sup>[23]</sup>研究发现, 23S rRNA 的 V 区基因突变与金黄色葡萄球菌利奈唑胺耐药, 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药密切相关; 文学琴<sup>[24]</sup>研究发现, 16S rDNA 的 A926G 单碱基突变与贵州地区幽门螺杆菌对四环素耐药相关。本研究中多药耐药菌株 EC-N32 和 EC-N35 的 16S rRNA 序列 C1 区、V1 区缺失, A257C 点突变; 广谱耐药的 EC-N4 菌株 C1 区、V1 区和 V2 区缺失, 这些 16S rRNA 序列的变化可能与大肠杆菌多药耐药的发生相关。

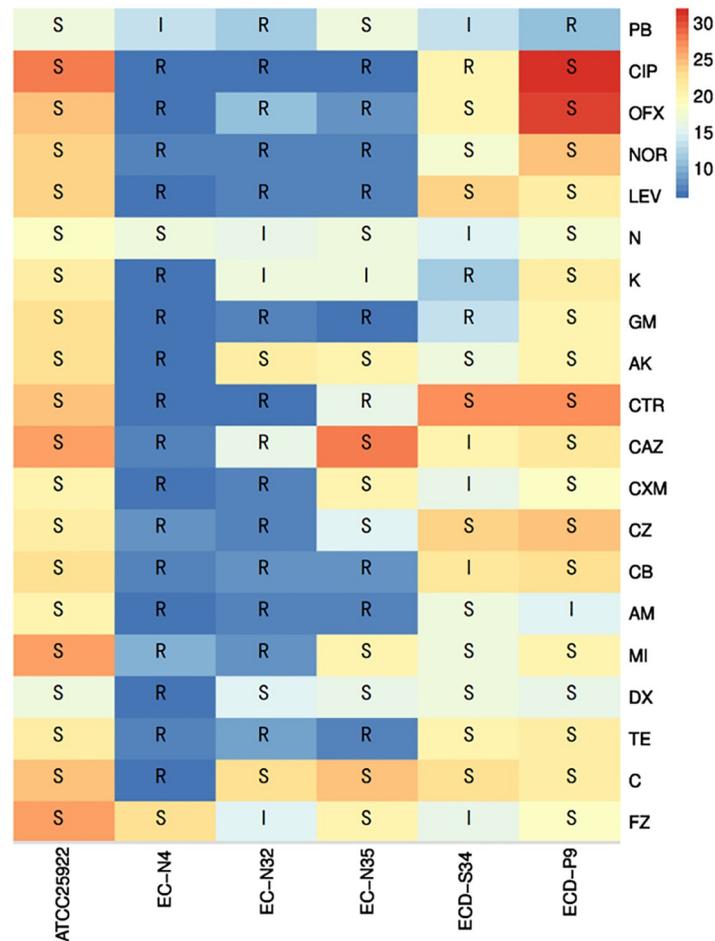


图6 16S rRNA 变异诱变耐药菌株的耐药性分析

PB 多粘菌素 B; CIP 环丙沙星; OFX 氧氟沙星; NOR 诺氟沙星; LEV 左氧氟沙星; N 新霉素; AK 丁胺卡那; GM 庆大霉素; K 卡那霉素; CTR 头孢曲松; CAZ 头孢他啶; CXM 头孢呋辛; CZ 头孢唑啉; CB 羧苄西林; AM 氨苄西林; 四环素 TE; 米诺环素 MI; 多西环素 DX; C 氯霉素; FZ 呋喃唑酮

Fig.6 Antibiotic-resistant analysis of 16S rRNA antibiotic-resistant *E. coli*

PB: polymyxin B, CIP: ciprofloxacin, OFX: ofloxacin, NOR: norfloxacin, LEV: levofloxacin, N: neomycin, AK: amikacin, GM: gentamicin, K: kanamycin, CTR: ceftriaxone, CAZ: ceftazidime, CXM: cefuroxime, CZ: cefazolin, CB: carbenicillin, AM: ampicillin, tetracycline: TE, minocycline: MI, doxycycline: DX, C: chloramphenicol, FZ: furazolidone

### 3 结论

16S rRNA 是目前公认的原核微生物系统发育和分子进化的分子计时器<sup>[14]</sup>。Marketa 等研究发现, *erm* 抗性基因序列受 16S rRNA 基因序列的连锁和位点特征的影响。ABC 转运蛋白基因的系统发育与 16S rRNA 基因的在属水平上相关<sup>[10,24]</sup>, 提示我们 16S rRNA 不仅与系统进化有关, 其突变与进化可能参与调控耐药相关基因的头合成。

利用电磁辐射或离子辐射可以加速生物体自然变异, 不同辐射源诱变机理和诱变效率差异较大。其中, <sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐射是目前最为常见的一种辐射源, 但穿透能力强, 对单个活细胞的损伤大, 且主要以能量沉积为主, 且较难防护; 等离子体辐

射对单个活细胞的损伤大, 突变率高, 诱变速度快, 环境安全, 但设备昂贵; 而低能 N<sup>+</sup> 注入诱变通过加速离子注入生物体内, 与胞内的分子、原子发生碰撞, 在局部区域释放出高能量, 显著诱导单链或双链 DNA 断裂、DNA 交联改变、末端受损及簇集损伤, 并通过能量局部集中沉积, 实现空间靶向诱变, 加速生物系统进化<sup>[2,20]</sup>。

本研究通过低能 N<sup>+</sup> 注入诱变大肠杆菌 ATCC25922 株, 筛选获得 4 株耐诺氟沙星大肠杆菌, 11 株耐多粘菌素 B 大肠杆菌和 10 株耐硫酸链霉素大肠杆菌, 其中 5 株诱变耐药株的 16S rRNA 基因分别出现 C1 区、V1 区、V2 区、V6~V9 区和 C6~C9 区片段缺失, 点突变(A257C), GC% 含量

增高, 其 C3 区、C5 区、C8 区和 V4 区、V5 区、V8 区二级结构出现共有的显著变化, 并且其抗生素耐药基因发生显著变化, 新增了氨基糖苷类、 $\beta$ -内酰胺类、喹诺酮类、四环素类抗性基因和多药耐药基因, 同时诱变菌株 EC-N4 株、EC-N32 株和 EC-N35 株获得了多药耐药特征。说明低能  $N^+$  注入可以驱动大肠杆菌 16S rRNA 基因一级结构的突变、片段缺失, 诱导二级结构显著变化, 进而调控耐药相关基因合成启动或终止, 进而使细菌产生耐药进化。研究为探索低能离子注入对大肠杆菌的分子进化和耐药性产生机制提供参考。

**作者贡献声明** 蔡长龙提出了研究思路并全程把关; 唐朝完成了干实验工作, 并与王婷、王雪瑞共同完成离子注入; 王婷完成了湿实验工作与数据整理分析; 陈明晖和王雪瑞对本文进行了校对和语言修改; 所有作者均已阅读并认可该论文最终版的所有内容。

## 参考文献

- 1 章琦, 李宝珍, 郑雪梅, 等. 2000—2020 年中国多重耐药菌研究热点的可视化分析[J]. 中国全科医学, 2022, **25**(24): 2960-2964. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2021.02.081.  
ZHANG Qi, LI Baozhen, ZHENG Xuemei, *et al.* Research hotspots of multidrug-resistant organisms in China from 2000 to 2020: a visualization analysis[J]. Chinese General Practice, 2022, **25**(24): 2960-2964. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2021.02.081.
- 2 赵瑞芳, 王海, 季天骄, 等. 一种生物可降解的高效广谱抗菌活性的纳米多肽聚合物[J]. 科学通报, 2015, **60**(14): 1328.  
ZHAO Ruifang, WANG Hai, JI Tianjiao, *et al.* A biodegradable nano-polypeptide polymer with high efficiency and broad-spectrum antibacterial activity[J]. Chinese Science Bulletin, 2015, **60**(14): 1328.
- 3 蔡长龙, 吕杰, 毛培宏, 等. 低能氮离子注入驱动 DOB 的 16S rRNA 基因突变与进化[J]. 西安工业大学学报, 2017, **37**(11): 781-786. DOI: 10.16185/j.jxatu.edu.cn.2017.11.001.  
CAI Changlong, LYU Jie, MAO Peihong, *et al.* DOB 16S rRNA gene mutation and evolution driven by low-energy nitrogen ion beam implantation[J]. Journal of Xi'an Technological University, 2017, **37**(11): 781-786. DOI: 10.16185/j.jxatu.edu.cn.2017.11.001.
- 4 刘敏瑞, 蔺朋武, 齐兴娥, 等. 基于 16S rRNA 和 RubisCO 基因对嗜酸硫杆菌的系统发育及多样性[J]. 微生物学报, 2016, **56**(4): 664-679. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150304.  
LIU Minrui, LIN Pengwu, Qi Xing'e, *et al.* Phylogenetic and diversity analysis of *Acidithiobacillus spp.* based on 16S rRNA and RubisCO genes homologues[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, **56**(4): 664-679. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150304.
- 5 Lagesen K, Hallin P, Rødland E A, *et al.* RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes [J]. Nucleic Acids Research, 2007, **35**(9): 3100-3108. DOI: 10.1093/nar/gkm160.
- 6 Nie H J, Chyan J B, Ying L P W, *et al.* Effect of gamma radiation on bacterial 16S rRNA gene[C/OL]. Proceedings of the Research and Development Seminar Nuklear Malaysia 2018, 2019: 275. (2022-11-22) [2023-10-04]. [http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig\\_q=RN:51073876](http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:51073876).
- 7 Rozhko T V, Guseynov O A, Guseynova V E, *et al.* Is bacterial luminescence response to low-dose radiation associated with mutagenicity? [J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2017, **177**: 261-265. DOI: 10.1016/j.jenvrad.2017.07.010.
- 8 包珊珊, 毛培宏. 基于基因组 *de novo* 测序的离子束重组沙漠寡营养细菌的 16S rRNA 基因研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, **36**(1): 277-280. DOI: 10.13417/j.gab.036.000277.  
BAO Shanshan, MAO Peihong. Study on 16S rRNA gene of desert oligotrophic bacteria recombined by ion beam based on *de novo* sequencing[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, **36**(1): 277-280. DOI: 10.13417/j.gab.036.000277.
- 9 Lepcha R T, Poddar A, Schumann P, *et al.* Comparative 16S rRNA signatures and multilocus sequence analysis for the genus *Salinicola* and description of *Salinicola acroporae* sp. nov, isolated from coral *Acropora digitifera* [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, **108**(1): 59-73. DOI: 10.1007/s10482-015-0464-9.
- 10 Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, *et al.* Using SPAdes *de novo* assembler[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2020, **70**(1): e102. DOI: 10.1002/cpbi.102.
- 11 Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX[J/OL]. Current Protocols in Bioinformatics, 2003, **2**: 2-3. (2022-

- 08-01) [2023-10-04]. DOI: 10.1002/0471250953.bi0203s00.
- 12 Edgar R C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity[J]. *BMC Bioinformatics*, 2004, **5**: 113. DOI: 10.1186/1471-2105-5-113.
- 13 Huelsenbeck J P, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees[J]. *Bioinformatics*, 2001, **17**(8): 754-755. DOI: 10.1093/bioinformatics/17.8.754.
- 14 Clewley J P, Arnold C. MEGALIGN. The multiple alignment module of LASERGENE[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1997, **70**: 119-129.
- 15 Gruber A R, Bernhart S H, Lorenz R. The ViennaRNA web services[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, **1269**: 307-326. DOI: 10.1007/978-1-4939-2291-8\_19.
- 16 Lorenz R, Hofacker I L, Stadler P F. RNA folding with hard and soft constraints[J]. *Algorithms for Molecular Biology: AMB*, 2016, **11**: 8. DOI: 10.1186/s13015-016-0070-z.
- 17 Pal C, Bengtsson-Palme J, Rensing C, *et al.* BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(Database issue): D737-D743. DOI: 10.1093/nar/gkt1252.
- 18 Yin X L, Jiang X T, Chai B L, *et al.* ARGs-OAP v2.0 with an expanded SARG database and Hidden Markov Models for enhancement characterization and quantification of antibiotic resistance genes in environmental metagenomes[J]. *Bioinformatics*, 2018, **34** (13): 2263-2270. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty053.
- 19 Melvin P. Weinstein , Thoms J K, James S L, *et al.* Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[M]. 30th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2020.
- 20 YU Zengliang. Introduction to ion beam biotechnology [M]. New York: Springer New York, 2006: 129-140. DOI: 10.1007/B135662.
- 21 Bobay L M, Ochman H. Impact of recombination on the base composition of bacteria and Archaea[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, **34**(10): 2627-2636. DOI: 10.1093/molbev/msx189.
- 22 李艳芬. 利奈唑胺体外诱导金黄色葡萄球菌耐药的实验研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2013: 18-23.
- LI Yanfen. Experimental study on drug resistance of *Staphylococcus aureus* induced by linezolid in vitro[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2013: 18-23.
- 23 Mnich E, Ibran J, Chmiela M. Treatment of helicobacter pylori infections in the light of the increase of antibiotic resistance[J]. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2018, **72**: 143-158. DOI: 10.5604/01.3001.0011.6469.
- 24 文学琴, 吴芳草, 刘芳, 等. 幽门螺杆菌四环素耐药与16S rDNA突变的关系[J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, **14**(4): 433-438. DOI: 10.13350/j.cjpb.190413.
- WEN Xueqin, WU Fangcao, LIU Fang, *et al.* Relationship between *Helicobacter pylori* resistance to tetracycline and 16S rDNA mutation[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2019, **14**(4): 433-438. DOI: 10.13350/j.cjpb.190413.