

• 综 述 •

质粒介导重排子的发现、结构和功能

易甜, 汪洋, 沈建忠, 吴聪明, 沈应博*

中国农业大学动物医学院, 北京 100193

易甜, 汪洋, 沈建忠, 吴聪明, 沈应博. 质粒介导重排子的发现、结构和功能[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 34-44.

YI Tian, WANG Yang, SHEN Jianzhong, WU Congming, SHEN Yingbo. Discovery, structure and function of plasmid mediated shufflon[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 34-44.

摘 要: 细菌耐药性已成为全球关注的重大公共卫生问题。接合转移是耐药质粒快速传播的重要方式, 其中IV型菌毛在此过程中发挥着重要的作用。IV型菌毛具有黏附作用, 能够使细菌黏附在宿主细胞和其他介质表面, 帮助细菌形成生物被膜、细菌聚集体和微菌落, 是细菌在液体中接合转移的重要因素。PilV 蛋白是 R64 质粒IV型菌毛尖端黏附素, 可以识别细菌细胞膜上的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。重排子(shufflon)结构是多重 DNA 倒位系统, 可使 PilV 蛋白多样化, 进而影响细菌液体接合转移过程中的受体菌识别和接合转移频率。重排子结构最先发现存在于 IncI1 质粒 R64, 后陆续在 IncI2、IncK、IncZ 质粒以及伤寒沙门氏菌致病岛中被发现, 其主要由 A、B、C、D 这 4 个片段及特异性重组位点 *sfx* 组成, 受其下游重组酶基因 *rci* 的调控, 不同质粒的重排子结构存在一定的差异。近期备受关注的可转移多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 主要位于 IncI2 型质粒上, 重排子可能是其快速传播的原因之一。本文综述了质粒介导重排子的发现、结构、功能和流行, 期望基于对重排子更全面深入地了解, 能够为耐药质粒的传播机制和控制策略研究提供理论基础。
关键词: 重排子; *pilV*; 接合转移; IV型菌毛; 耐药质粒

Discovery, structure and function of plasmid mediated shufflon

YI Tian, WANG Yang, SHEN Jianzhong, WU Congming, SHEN Yingbo*

College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: Antimicrobial resistance has become a major public health issue of global concern. Conjugation is an important way for fast spreading drug-resistant plasmids, during which the

资助项目: 国家自然科学基金(32273053, 81991535)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32273053, 81991535).

*Corresponding author. Tel: +86-10-62734255, E-mail: shenyb@cau.edu.cn

Received: 2022-04-28; Accepted: 2022-07-15

type IV pili plays an important role. Type IV pili can adhere on the surfaces of host cell and other medium, facilitating formation of bacterial biofilms, bacterial aggregations and microcolonies, and is also a critical factor in liquid conjugation. PilV is an adhesin-type protein found on the tip of type IV pili encoded by plasmid R64, and can recognize the lipopolysaccharide (LPS) molecules that locate on bacterial membrane. The shufflon is a clustered inversion region that diversifies the PilV protein, which consequently affects the recipient recognition and conjugation frequency in liquid mating. The shufflon was firstly discovered on an IncI1 plasmid R64 and has been identified subsequently in plasmids IncI2, IncK and IncZ, as well as the pathogenicity island of *Salmonella typhi*. The shufflon consists of four segments including A, B, C, and D, and a specific recombination site named sfx. The shufflon is regulated by its downstream-located recombinase-encoding gene *rci*, and different rearrangements of the shufflon region in different plasmids were observed. Mobile colistin resistance gene *mcr-I*, which has attracted substantial attentions recently, is mainly located in IncI2 plasmid. The shufflon may be one of the contributors to fast spread of *mcr-I*. Herein, we reviewed the discovery, structure, function and prevalence of plasmid mediated shufflon, aiming to provide a theoretical basis on transmission mechanism and control strategy of drug-resistant plasmids.

Keywords: shufflon; *pilV*; conjugation; type IV pili; drug-resistant plasmids

细菌对抗生素的耐药现象日益严重,多重耐药菌的快速扩散严重影响了抗生素在临床抗感染治疗中的效果,尤其治疗多重耐药革兰阴性菌的手段有限,因其对人类健康有着较大威胁而受到了全球的广泛关注^[1-2]。随着碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)的广泛流行,人们重新将多黏菌素作为临床治疗 CRE 感染的“最后一道防线”药物,但质粒介导的可转移多黏菌素耐药基因 *mcr-I* 的出现和快速扩散导致该防线面临被攻破的风险^[3-4]。革兰阴性菌通过获得外源耐药基因对多数药物产生耐药性,这些耐药基因主要位于质粒上,其快速水平转移是耐药性蔓延的重要原因之一。在水平传播中,细菌的接合转移是最主要的发生方式^[5]。因此,深入理解细菌耐药性传播的生物学规律有助于制定有效的防控策略从而遏制细菌耐药性的发展。

接合转移是供体菌的质粒通过细菌之间的接触传递至受体菌的过程,接合转移过程由IV

型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)介导^[6-7]。IV型菌毛是一套独立存在于多种细菌表面的系统,在细菌致病过程中发挥重要作用。它能够使细菌进行抽搐或滑动运动;有利于细菌黏附于宿主和其他物体表面;帮助细菌形成生物膜、生物聚集体和微菌落;此外还参与细胞侵袭、电子转移、噬菌体和 DNA 摄取等过程^[7-8]。

R64 质粒是携带IV型菌毛的经典质粒,共有 12 个 *pil* 基因编码IV型菌毛系统,对细菌在液体中的接合起决定性作用,其中 *pilV* 基因编码菌毛尖端的黏附素,能够识别细菌表面的 LPS,因而 *pilV* 基因对液体接合转移过程中的受体识别有着重要作用^[9-12]。重排子(shufflon)最早于 R64 质粒上发现,是临近 *pilV* 基因的多重 DNA 倒位系统,控制 *pilV* 变体的多样性使细菌产生不同的黏附素,介导供体菌和多种不同受体菌的接合^[13-14]。有学者将 shufflon 失活后,发现质粒在液体中向受体菌的转移频率明显下降,表明 shufflon 对于接合转移有着重要

的作用^[15]。基于上述背景,本文综述了 shufflon 的发现、结构和功能,旨在更全面地了解 shufflon 对耐药质粒传播的作用。

1 Shufflon 的生物学特征

1.1 Shufflon 的发现

1986 年, Komano 等首次用 *EcoR* I 对 R64 质粒进行酶切,发现有 2 个与质粒 DNA 摩尔质量比不相等的片段,将包含这 2 个区域的 DNA 进行克隆并用不同酶消化后,发现质粒 DNA 是 6 种或更多 DNA 种类的混合物,并且具有不同的 *EcoR* I、*Pst* I 和 *Ava* I 酶切位点,表明 DNA 存在复杂的重排^[16]。紧接着 Komano 等提出了一种模型来描述这个成簇的倒位区并命名为重排子 (shufflon),随后作者又通过 Southern 印记杂交验证了质粒 R64 上存在 shufflon 结构^[13,16-17]。

1.2 Shufflon 的结构

本文以 R64 质粒的 shufflon 为例,对 shufflon 的结构进行描述。如图 1 所示,shufflon 具有 4 个 DNA 片段,分别为 A 和 A'、

D'、B 和 B'以及 C 和 C',其中 A、B、C 均由 2 个方向相反的片段组成,而 D 只有单一的片段,此外 R64 有 7 个由 19 bp 重复序列组成的特异性重组位点,它们以相同或者相反的方向排列,2 个重组位点之间存在能够反转的 8 bp 序列^[13]。在 19 bp 的重复序列中(图 2A)根据其中 3 bp 的可变序列将重组位点分为 4 种类型: repeat-a、repeat-b、repeat-c 和 repeat-d。片段 A、B 和 C 两端均有 2 个反向重复序列,分别是 2 个 a 重复序列、2 个 b 重复序列、重复序列 b 和重复序列 c,片段 D 两端只有 1 个重复序列 d 和其他片段^[13,18-19]。经过后续研究重新确定重组位点为 31 bp 的 sfx 序列,如图 2B 所示,由中央的 7 bp 间隔序列和左右各 12 bp 的臂序列组成^[20]。R64 质粒 sfx 序列的中间序列和右臂序列是保守的,中间的间隔序列和右臂序列是以前 19 bp 重复序列,而左臂序列不保守且和右臂序列无关^[20]。由于 R64 质粒的 shufflon 结构中存在 4 个不同的右臂序列和 5 个不同的左臂序列,因此可能会有 19 种不同的 sfx 序列组合^[20]。

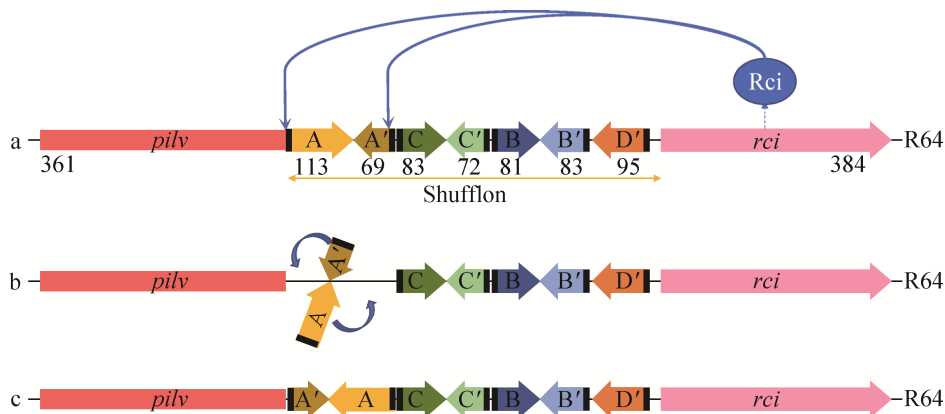


图 1 重排子反转示意图

Figure 1 Schematic illustration of shufflon inversion in plasmid R64. Each arrow with different color represents different segments and the transcriptional orientation, and protein size is indicated by the number of amino acids below each arrow; the specific recombination site sfx was indicated by black rectangle, which is regulated by Recombinase Rci and inverts the terminal segment of *pilV* from *pilV*-A' to *pilV*-A (panel c) (data come from Allard)^[21].

1.3 Shufflon 的重排

Komano 等发现 shufflon 的重排受其下游的 *rci* 基因调控, 并将此基因表达的酶命名为成簇倒位重组酶; Rci 酶通常只作用于 2 个反向重复序列(sfx 序列), 然后反转 *pilV* 基因 C 端的部分基因序列(图 1), 由此可以通过检测 *rci* 活性来判断 shufflon 的完整性^[16,18,22]。有研究人员推断了重组酶 Rci 结合 sfx 序列的模型: 最初 1 个 Rci 分子以序列特异性方式与保守的 sfx 右臂结合, 导致 Rci 分子的构象变化使 Rci 与右臂结合的区域形成 C 端多聚体结构域; 该区域会招募第 2 个 Rci 分子并以非序列特异性的方式与 sfx 左臂结合^[20,23]。Rci 酶的 C 端结构域对于这种机制是必不可少的, 并且只允许分子内发生反转反应^[23]。第 2 个 Rci 分子与左臂的结合可能会协同进行, sfx 序列的不对称性可能是因为 Rci 蛋白作用于反向序列^[23]。实验证明 sfx 位点的不对称性抑制了分子内 sfx 位点之间的直接重组(即不依赖 Rci 酶作用), 不同 sfx 的左臂序列和右臂序列极大地影响了体内和体外的反转频率, 具有高 Rci 亲和力的 sfx 序列往往表现出较高的重组活性^[20,23]。此外, 有研究表明 shufflon 发生重组过程中需要 HU 蛋白的参

与(HU 蛋白是大肠杆菌类核蛋白中结合蛋白质的主要成分)^[18,24]。

R64 质粒的 shufflon 有 4 个可逆的片段 A、B、C 和 D, 它们可以单独或者成组地反转, 通过重组形成不同的 *pilV* 基因, shufflon 片段的反转频率从高到低依次是 A、B 和 C, 反转片段之间的距离缩短对于反转频率没有影响, 但是距离增加会降低反转频率, 重复序列的重组活性从高到低依次是: a、d、b 和 c^[13,16,18]。有学者研究了高细胞密度、营养缺乏或抗生素压力下不同时间段 shufflon 的变化, 发现无论是出现的变体数量还是变体出现的速度均没有显著差异, 由此可以判断高细胞密度、营养缺乏和抗生素压力对于 shufflon 重排无显著影响^[26]。研究人员将携带 shufflon 的同一质粒转移到不同宿主菌中后检测不同宿主菌对 shufflon 重排的影响, 发现 shufflon 的可逆片段在不同宿主菌之间的顺序发生了变化, 这表明 shufflon 的结构与宿主菌存在关联性^[26]。

1.4 Shufflon 的功能

目前, shufflon 的功能主要聚焦于对细菌接合转移的影响。接合转移可在固体表面和液体中进行, 其中 IV 型菌毛能够使细菌进行抽播

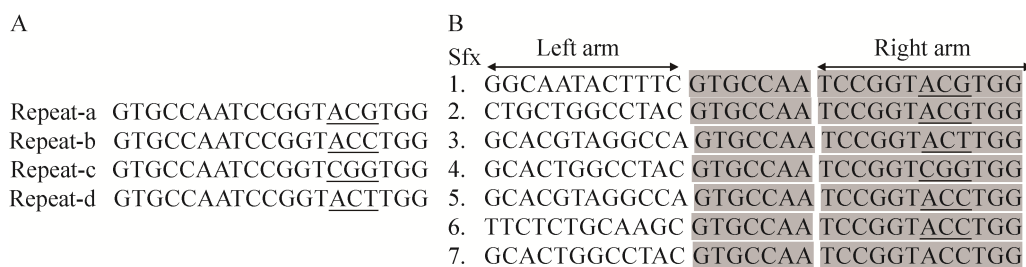


图 2 19 bp 的特异性重组位点序列和 31 bp 的 sfx 序列示例

Figure 2 Examples of the sequences of 19-bp specific recombination sites and a 31-bp sfx. A: The original 19 bp specific recombination sites: repeat-a, repeat-b, repeat-c, and repeat-d (data from Gyohda)^[25]. The 3 bp of variable sequences are shown as underline. B: The redefined 31 bp sfx sequences, of which the original 19 bp sequences are indicated by grey background, meanwhile the left arm, right arm, and 7 bp spacer sequence are separated by a single space (data from Gyohda)^[23].

或滑动运动并形成生物聚集体和微菌落,是液体中发生接合转移的重要条件^[7-8]。IV型菌毛由 *pil* 基因簇编码,其中 *pilV* 基因编码菌毛尖端的黏附素,其 C 端片段表达为具有谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)的融合蛋白,GST 融合蛋白能够与相对应的 LPS 结合,在液体接合转移中决定受体菌的识别^[11,27-29]。Shufflon 的重排作用是通过产生不同的 *pilV* 基因 C 端片段形成不同的 IV 型菌毛尖端黏附素,进而识别不同的接合转移受体菌;前期研究发现, PilV-A 和 PilV-A' 黏附素能够识别大肠杆菌 C 的 LPS, PilV-A' 黏附素能够识别大肠杆菌 B, PilV-A'、PilV-B' 和 PilV-C' 黏附素能够识别鼠伤寒沙门氏菌 LT2 的 LPS, PilV-A'、PilV-C' 和 PilV-C 能够识别大肠杆菌 K-12 的 LPS, PilV-A'、PilV-D' 能够识别弗氏志贺氏菌^[9-11,30]。此外,不同的 PilV 蛋白在液体中进行接合时能够和多种不同受体菌形成聚集体,从而帮助接合转移进行^[9]。以上研究提示 shufflon 结构在液体接合转移过程的受体菌识别中起到了重要的作用。

有研究者发现当细菌携带缺少 shufflon 结构的 R64 质粒时,其在液体中的接合转移频率明显降低,其原因可能是 shufflon 的缺失导致了 IV 型菌毛的不完整,最终影响了接合转移频率^[15]。另有研究发现在液体培养中携带 R64 质粒的大肠杆菌,其 shufflon 和 *pilV* 基因构成分别为 *pilV*-A'、-C 和 -C' 时,细菌群落更易形成聚集体,且对 *E. coli* K-12 的接合转移频率显著高于其他类型(*pilV*-A、-B 和 -B');当受体菌为 *E. coli* C 时,则 *pilV*-A 和 *pilV*-A' 表现出更高的接合转移频率,该结果表明细菌形成聚集体的能力和接合转移频率密切相关^[14]。Turner 等经分析发现 pB15 的质粒中有 8 种被归类为“毒性”(高接合、低垂直转移和四环素抗性)的进化

质粒都显示出和原始质粒一样的 shufflon 活性,但被归类为“无毒”(低接合、高垂直转移和四环素敏感性)的 6 种质粒却呈现出相反的结果,它们接合能力下降,而且在这 6 种质粒中的 shufflon 均没有活性,表明 shufflon 对于接合转移具有重要的作用^[30]。Cottell 等对携带有 β -内酰胺类药物耐药基因 *bla*_{CTX-M-14} 的 pCT 质粒的 6 个特殊基因(*tra* 和 *pil* 基因座、shufflon *rci* 重组酶基因、*sigma* 因子、*parB* 分区基因、*pndACB* 毒素-抗毒素系统)进行了研究,作者敲除 *Rci* 重组酶基因后发现在液体培养基中 pCT 质粒向鼠伤寒沙门氏菌转移的频率降低^[15,31]。以上研究结果表明 shufflon 对细菌在液体中的接合转移频率有重要的影响。

2 Shufflon 的流行情况

2.1 Inc11 型质粒

Turner 等用焦磷酸测序方法获得了 Inc11 型质粒 pB15 的整个基因组,发现 pB15 拥有和 R64 高度相似的 shufflon 结构^[30]。R621a 质粒的转移区在基因组成上和 R64 十分相似,shufflon 结构位于 *pilV* 基因的 3' 区域,同样具有 A、B、C 和 D 4 种片段(图 3)^[17,32]。Komano 等对 ColIb 进行了 *EcoR* I 消化和 *Rci* 酶活性检测,证明了 ColIb 也具有 shufflon 结构,但与 R64 的结构稍有不同,由此猜测可能是 shufflon 变体,并推断可能具有 A、B 和 C 3 种片段^[17]。ColIb-p9 属于 Inc11 组质粒与 R64 的 shufflon 结构差异表现在以下 3 点(图 3):首先,ColIb-p9 质粒只有与 R64 相同的 A、B 和 C 3 个片段,缺乏 D 片段;其次,R64 有 7 个重组位点,但是 ColIb-p9 只有 6 个与之一致的重组位点;最后,*rci* 基因具有同样的活性,但存在 4 个碱基的差异^[19]。

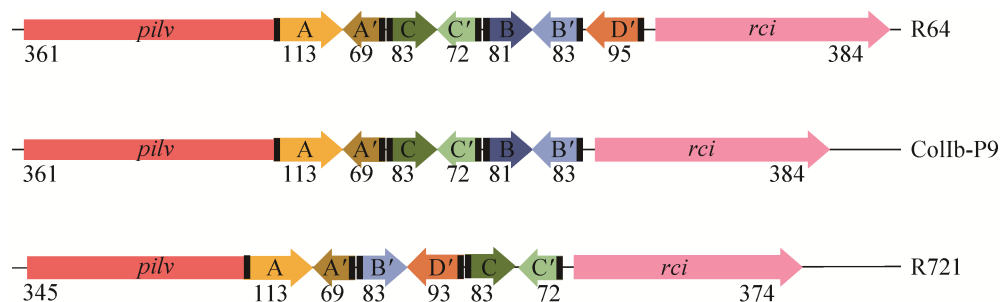


图3 R64 (IncI1)、Collb-P9 (IncI1)、R721 (IncI2)的 shufflons 结构示意图

Figure 3 Schematic diagram of the shufflons of plasmids R64 (IncI1), Collb-P9 (IncI1), and R721 (IncI2). Each arrow with different color represents the different segments and transcriptional orientation; The black solid area indicates the specific recombination sites, sfx; The numbers below the arrows represent the number of amino acids of corresponding segments; Segment D has only one sfx and open reading frame; Segments A, B, C and BD have two sfx (data come from Allard)^[21].

2.2 IncI2 型质粒

Komano 等用和 IncI1 同样的方法对 IncI2 质粒进行了检测,发现 IncI2 质粒 TP114 和 R721 都有与 R64 类似的 shufflon 结构,而且具有 Rci 酶活性,而 IncI ζ 质粒 R805a 具有 shufflon 结构但没有 Rci 活性^[17,33]。R721 的 shufflon 和 R64 具有相关性但不完全相同, R721 的 *pilV* 基因恒定区由 345 个氨基酸残基组成,而 R64 中 *pilV* 基因的恒定区由 361 个氨基酸残基组成,其氨基酸序列的相似性为 51%,而 DNA 相似性仅为 38%。R721 中 *pilV* 序列 C 端的 1/3 氨基酸与 R64 相应序列有 86% 的相似度,但靠近 N 端的 1/3 氨基酸序列相似度仅有 28%,此外 R64 和 R721 转移区域则无相似之处^[33-34]。R721 中 shufflon 有 A、C 和 BD 3 种片段,其排列和 R64 相似(图 3),其中 A、C 片段和 R64 的 A、C 片段相同,但是 BD 片段是 R721 独有的片段,它的右半部分和 R64 的 D 片段同源,而它的左半部分和 R64 的 B 片段同源^[34]。对 R721 的核苷酸序列分析发现, R721 的 shufflon 有 6 个 19 bp 的重复序列,它们与 R64 中 shufflon 的重复序列同源且排列方式一致,此外 R721 的 19 bp 重复序列的左侧 13 bp

和右侧 3 bp 是完全保守的,这种情况和 R64 完全相同^[34]。R721 的 Rci 蛋白和 R64 的相似度高达 64%^[34]。

IncI2 的 shufflon 区域并不是高度保守的, Sekizuka 等用单分子测序(single molecular real-time, SMRT)和 Illumina 对大肠杆菌 MRY16-002 (ST117)、MRY15-117 (ST457)和 MRY15-131 (ST457)进行了测序,发现每个菌株都有不同的 shufflon 结构,而 2 个相同 ST 型(ST457)菌株 MRY15-117 和 MRY15-131 质粒上的 shufflon 也存在片段 C 的插入或缺失^[35]。这表明 shufflon 的片段数目是依据某种规律动态变化的,其组合模式在不同 ST 型甚至同一种 ST 型之间均可不同。

2.3 IncZ 型质粒

Venturini 等从大肠杆菌中分离了具有 IS26 相关分子特征的 2 个多重耐药质粒,1 个是来自人 O26: 肠出血性大肠杆菌 H-EHEC (enterohemorrhagic *Escherichia coli*)型细菌的 pO26-CRL₁₂₅ 质粒,另 1 个是来自牛肠致病性大肠杆菌 O111a-EPEC (enteropathogenic *Escherichia coli*)型细菌的 pO111-CRL₁₁₅ 质粒,它们对氨苄青霉素、卡那霉素、新霉素、

链霉素、磺胺噻唑和三甲氧苄青霉素都具有耐药作用^[36]。基因序列分析表明这 2 个质粒的大部分骨架和 IncI 质粒序列具有同源性,而有一些模块则和 IncZ、IncB、IncP-1 α 相似。这 2 个质粒重组酶 Rci 的基因序列和肠道沙门氏菌 HadarICESe4 的噬菌体序列中发现的基因几乎相同(相似度达到 92%)^[36]。这 2 个质粒的 shufflon 结构仅由与 IncI1 型质粒中片段 B 同源的单一片段组成,因而 PilV 蛋白只有 2 种可能的 C 端结构^[36]。

2.4 IncK 型质粒

Cottell 等从犊牛上分离了 2 株对多种 β -内酰胺类抗生素耐药的大肠杆菌,从其中 1 株大肠杆菌 C159/11 中分离到携带 *bla*_{CTX-M-14} 耐药基因的质粒 pCT,此质粒属于 IncK 型质粒^[37]。对质粒全基因组测序,发现质粒中的 *pil* 基因区域存在多种形式,同时也发现了重组酶的基因 *rci*,其结构和 shufflon 一致,因此证明了 shufflon 在 pCT 质粒上的存在^[37]。Seiffert 等在家禽肉和人类尿液样本中分离的 7 种大肠杆菌菌株携带 IncB/O/K 样质粒,发现它们属于新质粒变体 IncK2,对这 7 个质粒进行测序发现它们有高度可变的 shufflon 区域^[38]。

2.5 伤寒沙门氏菌致病岛

Zhang 等在伤寒沙门氏菌的致病岛上发现了 *pilV* 和 *rci* 基因,其中 Rci 蛋白与 IncI2 质粒 R721 中的氨基酸同源性达到 90%,此外,其 *sfx* 序列和 R721 中的序列相似性达 90%^[29]。其中 1 种 PilV 蛋白 PilV1 的 C 端可逆区域和 R721 或 R64 相似,而另 1 种 PilV 蛋白 PilV2 与任何质粒的 shufflon 都没有同源性^[29]。伤寒沙门氏菌的 *pil* 基因位于染色体“致病岛”上,其中的 *pilV* 基因可产生 1 种特定的黏附因子,可以用于识别大肠杆菌 K-12 的外膜决定簇^[29]。沙门氏菌中的 shufflon 对于伤寒发病机制十分重

要,Rci 活性受到 DNA 是否超螺旋的影响,当 DNA 超螺旋时,Rci 酶的活性会增加,在反转活性高时会产生无 PilV 的菌毛,而在活性低时会产生有 PilV 的菌毛^[39]。副伤寒丙型血清型沙门氏菌的 shufflon 则无活性,其 Rci 重组酶无法作用于反向重复序列^[40]。

2.6 其他

Komano 等对一系列质粒进行了 *EcoR* I 酶消化模式检测、Southern 印记杂交检测及 Rci 酶活性检测,发现 IncF 质粒 F (IncFI)、R386 (IncFI)、R100-1 (IncFII)、R124 (IncFIV)、IncH 质粒 R27 (IncH1)、R478 (IncH2)、TP116 (IncH2)、IncB 质粒 R16、IncC 质粒 R40a、IncJ 质粒 R391、IncK 质粒 R387、IncN 质粒 N3、IncP 质粒 RP4、IncS 质粒 R477-1、IncT 质粒 Rts1、IncW 质粒 R388 及 IncX 质粒 R6K 均未检测到 shufflon 结构^[17]。IncY 质粒 p15B 发现有 1 个 DNA 重组系统,命名为 Min,和 shufflon 没有同源性,不属于 shufflon 结构^[41]。

3 问题与展望

表 1 总结了目前已发现的 shufflon 结构,表明 shufflon 存在于多种类型的质粒上,其他质粒是否存在类似功能与结构的片段还需进一步探索。质粒是耐药基因、毒力基因等功能基因水平转移的重要载体,细菌通过质粒获得耐药性是其演化进程中的重要里程碑,也增加了人类治疗细菌感染性疾病的难度。以多黏菌素为例,其作为治疗多重耐药革兰阴性菌感染“最后一道防线”药物,在可转移多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 被发现后,多黏菌素耐药性问题受到了全球各界的广泛关注^[4,42]。前期针对 *mcr-1* 菌株接合转移能力的研究中发现不同携带 *mcr-1* 的菌株(包括相同 ST 型的菌株)在接合转移时,能够成功接受其质粒的受体菌(大肠杆菌 C600 和/或

表 1 Shufflon 的来源、结构及相应质粒的接合转移频率

Table 1 Origin, structure, and conjugation frequency of shufflon

Plasmid	Organism	Isolation source	Resistance	Incompatibility group	Shufflon segments	Donor strain	Recipient strain	Conjugation frequency	Reference
pESBL-4	<i>E. coli</i>	Human		IncI1	A, B, C, D				[26]
pESBL-12	<i>E. coli</i>	Human		IncI1	A, B, C				
pESBL-283	<i>E. coli</i>	Swine		IncI1	A, B, C				[35]
pESBL-117	<i>E. coli</i>	Human		IncI1	A, B, C				
pESBL-305	<i>E. coli</i>	Poultry		IncI1	A, B, C				
pESBL-355	<i>E. coli</i>	Poultry		IncI1	A, B				
pMRY16-002-4	<i>E. coli</i>	Swine	Polymyxin	IncI2	A, C, BD				
pMRY15-117-1	<i>E. coli</i>	Cattle	Polymyxin	IncI2	BD, C				[30]
pMRY15-131-2	<i>E. coli</i>	Cattle	Polymyxin	IncI2	BD				
pB15			Tetracycline, kanamycin, neomycin	IncI1	A, B, C, D	<i>E. coli</i> REL5382	<i>E. coli</i> REL1206	$1.0\times10^{-12.629}$	
pCT	<i>E. coli</i>	Cattle	Beta-lactams	IncK		<i>E. coli</i>	Rifampicin-resistant <i>E. coli</i> DH5	Solid 1.0×10^{-5} ; liquid 1.0×10^{-5}	[15]
							<i>S. typhimurium</i> SL1433	Solid 1.0×10^{-5} ; liquid 1.0×10^{-4}	
pO26CRL125	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>		Ampicillin, kanamycin, neomycin, streptomycin, sulfathiazole, trimethoprim penicillin	Inc11/IncZ/IncB	A part of B, C segment#	<i>E. coli</i> TOP10	Rifampicin-resistant <i>E. coli</i> JM109	3.3×10^{-4}	[36]
pO111-CRL115	Atypical enteropathogenic <i>E. coli</i>		Ampicillin, kanamycin, neomycin, streptomycin, sulfathiazole, trimethoprim penicillin	Inc11/IncZ/IncB	A part of B, C segment #	<i>E. coli</i> TOP10	Rifampicin-resistant <i>E. coli</i> JM109	3.7×10^{-4}	[36]
R621a	<i>S. typhimurium</i>		Tetracycline	IncI1	A, B, C, D	<i>E. coli</i> JM83	<i>E. coli</i> TN102	19% (donor strain/recipient strain)	[32]

#: B open reading frame (ORF) of B segment, and the C' ORF of C segment in plasmid R64.

EC600)和接合转移频率(10^{-10} – 10^{-1} 之间)存在差异^[43]。后续研究通过全基因组测序鉴定了上述菌株发现的 *mcr-1* 基因多位于 IncI2 型质粒上,同时该类型质粒的骨架十分保守仅在少数区域存在差异(包括 *pilV* 区域),提示其 shufflon 结构存在差异^[44]。此外,多项研究同样揭示了携带 *mcr-1* 的 IncI2 型质粒中 shufflon 结构具有多样性,但均无深入解析该结构与接合转移受体菌范围和接合转移频率间的关系^[45-47]。虽然前期研究表明,shufflon 通过重组改变 *pilV* 的末端片段影响供体菌对接合转移受体菌的识别,亦可影响在液体中与受体菌的接合频率,表明 shufflon 结构在质粒的水平传播中发挥着重要作用^[12,15]。但 Sekizuka 等利用 SMRT 结合 Illumina 测序对 shufflon 结构进行了检测,发现其片段数量和重排具有多样性,其不同结构的比例也具有多样性,表明 shufflon 存在片段数量和比例的动态变化过程,其具体生物学意义还存在量的维度^[35]。因此,定量 shufflon 片段和比例与受体菌识别和接合转移频率间的关系是回答 shufflon 多样性和菌群功能多样性乃至生物多样性间关系的重要基础。未来,将三代测序(Pacbio 和 Nanopore 等)读长长与二代测序通量高的优势相结合,提高鉴定 shufflon 片段组成的准确率,能够为其生物学特征提供重要技术支撑。进一步,通过定量关系建立数学模型精确测算携带 shufflon 结构质粒(如携带 *mcr-1* 的 IncI2 型质粒)的传播动力学特征(如受体菌种属、接合转移频率等),能够为理解该类质粒在多种宿主菌间快速转移的原因和评估该类质粒传播的风险等提供科学依据。

综上所述,shufflon 虽然发现较早且在多种不同类型的质粒中均存在,但其片段数量和比例在单菌落中的多样性在近些年才被揭示,该结构在质粒传播中的作用及其对生物多样性的

意义还有待深入研究。

REFERENCES

- [1] HAWKEY PM. The growing burden of antimicrobial resistance[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 62(suppl_1): i1-i9.
- [2] DRAENERT R, SEYBOLD U, GRÜTZNER E, BOGNER JR. Novel antibiotics: are we still in the pre-post-antibiotic era?[J]. Infection, 2015, 43(2): 145-151.
- [3] POTTER RF, D'SOUZA AW, DANTAS G. The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae[J]. Drug Resistance Updates, 2016, 29: 30-46.
- [4] LIU YY, WANG Y, WALSH TR, YI LX, ZHANG R, SPENCER J, DOI Y, TIAN GB, DONG BL, HUANG XH, YU LF, GU DX, REN HW, CHEN XJ, LV LC, HE DD, ZHOU HW, LIANG ZS, LIU JH, SHEN JZ. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2016, 16(2): 161-168.
- [5] LERMINIAUX NA, CAMERON ADS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2019, 65(1): 34-44.
- [6] CABEZÓN E, RIPOLL-ROZADA J, PEÑA A, de la CRUZ F, ARECHAGA I. Towards an integrated model of bacterial conjugation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2015, 39(1): 81-95.
- [7] LUKASZCZYK M, PRADHAN B, REMAUT H. The biosynthesis and structures of bacterial pili[J]. Sub-Cellular Biochemistry, 2019, 92: 369-413.
- [8] HOSPENTHAL MK, COSTA TRD, WAKSMAN G. A comprehensive guide to pilus biogenesis in gram-negative bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(6): 365-379.
- [9] ISHIWA A, KOMANO T. The lipopolysaccharide of recipient cells is a specific receptor for PilV proteins, selected by shufflon DNA rearrangement, in liquid matings with donors bearing the R64 plasmid[J]. Molecular and General Genetics MGG, 2000, 263(1): 159-164.
- [10] ISHIWA A, KOMANO T. Thin Pilus PilV adhesins of plasmid R64 recognize specific structures of the lipopolysaccharide molecules of recipient cells[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(17): 5192-5199.

- [11] ISHIWA A, KOMANO T. PilV adhesins of plasmid R64 thin pili specifically bind to the lipopolysaccharides of recipient cells[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 343(3): 615-625.
- [12] THANASSI DG, BLISKA JB, CHRISTIE PJ. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(6): 1046-1082.
- [13] KOMANO T, KUBO A, NISIOKA T. Shufflon: multi-inversion of four contiguous DNA segments of plasmid R64 creates seven different open reading frames[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(3): 1165-1172.
- [14] YOSHIDA T, FURUYA N, ISHIKURA M, ISOBE T, HAINO-FUKUSHIMA K, OGAWA T, KOMANO T. Purification and characterization of thin pili of IncI1 plasmids ColIb-P9 and R64: Formation of PilV-specific cell aggregates by type IV pili[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(11): 2842-2848.
- [15] COTTELL JL, SAW HTH, WEBBER MA, PIDDOCK LJV. Functional genomics to identify the factors contributing to successful persistence and global spread of an antibiotic resistance plasmid[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 168.
- [16] KOMANO T, KUBO A, KAYANUMA T, FURUICHI T, NISIOKA T. Highly mobile DNA segment of IncI alpha plasmid R64: a clustered inversion region[J]. *Journal of Bacteriology*, 1986, 165(1): 94-100.
- [17] KOMANO T, KIM SR, NISIOKA T. Distribution of shufflon among IncI plasmids[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(11): 5317-5319.
- [18] GYOHDA A, FUNAYAMA N, KOMANO T. Analysis of DNA inversions in the shufflon of plasmid R64[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(6): 1867-1871.
- [19] KIM SR, KOMANO T. Cloning and nucleotide sequence of the ColIb shufflon[J]. *Plasmid*, 1989, 22(2): 180-184.
- [20] GYOHDA A, FURUYA N, KOGURE N, KOMANO T. Sequence-specific and non-specific binding of the rci protein to the asymmetric recombination sites of the R64 shufflon[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 318(4): 975-983.
- [21] ALLARD N, NEIL K, GRENIER F, RODRIGUE S. The type IV *Pilus* of plasmid TP114 displays adhesins conferring conjugation specificity and is important for DNA transfer in the mouse gut microbiota[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(2): e0230321.
- [22] TAM CKP, HACKETT J, MORRIS C. Rate of inversion of the *Salmonella enterica* shufflon regulates expression of invertible DNA[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(9): 5568-5577.
- [23] GYOHDA A, ZHU SJ, FURUYA N, KOMANO T. Asymmetry of shufflon-specific recombination sites in plasmid R64 inhibits recombination between direct *sfx* sequences[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(30): 20772-20779.
- [24] WADA M, KUTSUKAKE K, KOMANO T, IMAMOTO F, KANO Y. Participation of the *hup* gene product in site-specific DNA inversion in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1989, 76(2): 345-352.
- [25] GYOHDA A, FURUYA N, ISHIWA A, ZHU SJ, KOMANO T. Structure and function of the shufflon in plasmid r64[J]. *Advances in Biophysics*, 2004, 38: 183-213.
- [26] BROUWER MSM, JURBURG SD, HARDERS F, KANT A, MEVIUS DJ, ROBERTS AP, BOSSERS A. The shufflon of IncI1 plasmids is rearranged constantly during different growth conditions[J]. *Plasmid*, 2019, 102: 51-55.
- [27] KOMANO T, KIM SR, YOSHIDA T. Mating variation by DNA inversions of shufflon in plasmid R64[J]. *Advances in Biophysics*, 1995, 31: 181-193.
- [28] KOMANO T, KIM SR, YOSHIDA T, NISIOKA T. DNA rearrangement of the shufflon determines recipient specificity in liquid mating of IncI1 plasmid R64[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 243(1): 6-9.
- [29] ZHANG XL, MORRIS C, HACKETT J. Molecular cloning, nucleotide sequence, and function of a site-specific recombinase encoded in the major 'pathogenicity island' of *Salmonella typhi*[J]. *Gene*, 1997, 202(1/2): 139-146.
- [30] TURNER PE, WILLIAMS ESCP, OKEKE C, COOPER VS, DUFFY S, WERTZ JE. Antibiotic resistance correlates with transmission in plasmid evolution[J]. *Evolution*, 2014, 68(12): 3368-3380.
- [31] LIEBANA E, BATCHELOR M, HOPKINS KL, CLIFTON-HADLEY FA, TEALE CJ, FOSTER A, BARKER L, THRELFALL EJ, DAVIES RH. Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(5): 1630-1634.
- [32] TAKAHASHI H, SHAO M, FURUYA N, KOMANO T. The genome sequence of the incompatibility group Iy plasmid R621a: evolution of IncI plasmids[J]. *Plasmid*,

- 2011, 66(2): 112-121.
- [33] KOMANO T, FUJITANI S, FUNAYAMA N, KANNO A, SAKUMA K. Physical and genetic analyses of IncI2 plasmid R721: evidence for the presence of shufflon[J]. *Plasmid*, 1990, 23(3): 248-251.
- [34] KIM SR, KOMANO T. Nucleotide sequence of the R721 shufflon[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(21): 7053-7058.
- [35] SEKIZUKA T, KAWANISHI M, OHNISHI M, SHIMA A, KATO K, YAMASHITA A, MATSUI M, SUZUKI S, KURODA M. Elucidation of quantitative structural diversity of remarkable rearrangement regions, shufflons, in IncI2 plasmids[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 928.
- [36] VENTURINI C, HASSAN KA, ROY CHOWDHURY P, PAULSEN IT, WALKER MJ, DJORDJEVIC SP. Sequences of two related multiple antibiotic resistance virulence plasmids sharing a unique IS26-related molecular signature isolated from different *Escherichia coli* pathotypes from different hosts[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78862.
- [37] COTTELL JL, WEBBER MA, COLDHAM NG, TAYLOR DL, CERDEÑO-TÁRRAGA AM, HAUSER H, THOMSON NR, WOODWARD MJ, PIDDOCK LJV. Complete sequence and molecular epidemiology of IncK epidemic plasmid encoding blaCTX-M-14[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(4): 645-652.
- [38] SEIFFERT SN, CARATTOLI A, SCHWENDENER S, COLLAUD A, ENDIMIANI A, PERRETEN V. Plasmids carrying bla_{CMY-2/4} in *Escherichia coli* from poultry, poultry meat, and humans belong to a novel IncK subgroup designated IncK2[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 407.
- [39] MORRIS C, YIP CMC, TSUI ISM, WONG DKH, HACKETT J. The shufflon of *Salmonella enterica* serovar Typhi regulates type IVB pilus-mediated bacterial self-association[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(3): 1141-1146.
- [40] TAM CKP, HACKETT J, MORRIS C. *Salmonella enterica* serovar Paratyphi C carries an inactive shufflon[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(1): 22-28.
- [41] SANDMEIER H, IIDA S, MEYER J, HIESTAND-NAUER R, ARBER W. Site-specific DNA recombination system Min of plasmid p15B: a cluster of overlapping invertible DNA segments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(3): 1109-1113.
- [42] LI J, NATION RL, TURNIDGE JD, MILNE RW, COULTHARD K, RAYNER CR, PATERSON DL. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2006, 6(9): 589-601.
- [43] WANG Y, TIAN GB, ZHANG R, SHEN YB, TYRRELL JM, HUANG X, ZHOU HW, LEI L, LI HY, DOI Y, FANG Y, REN HW, ZHONG LL, SHEN ZQ, ZENG KJ, WANG SL, LIU JH, WU CM, WALSH TR, SHEN JZ. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2017, 17(4): 390-399.
- [44] SHEN YB, WU ZW, WANG Y, ZHANG R, ZHOU HW, WANG SL, LEI L, LI M, CAI JC, TYRRELL J, TIAN GB, WU CM, ZHANG QJ, SHEN JZ, WALSH TR, SHEN ZQ. Heterogeneous and flexible transmission of *mcr-1* in hospital-associated *Escherichia coli*[J]. *mBio*, 2018, 9(4): e00943-18.
- [45] LI WY, LI YS, JIA YT, SUN HR, ZHANG CH, HU GZ, YUAN L. Genomic characteristics of *mcr-1* and bla_{CTX-M-type} in a single multidrug-resistant *Escherichia coli* ST93 from chicken in China[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(5): 101074.
- [46] LI XP, SUN RY, SONG JQ, FANG LX, ZHANG RM, LIAN XL, LIAO XP, LIU YH, LIN J, SUN J. Within-host heterogeneity and flexibility of *mcr-1* transmission in chicken gut[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, 55(1): 105806.
- [47] MA QX, HUANG Y, WANG J, XU XB, HAWKEY J, YANG CJ, LIANG BB, HU XF, WU FL, YANG XX, WANG JY, LI RR, LI P, XIE J, JIA LL, WANG LG, HAO RZ, TONG YG, HOLT KE, QIU SF, et al. Multidrug-resistant *Shigella sonnei* carrying the plasmid-mediated *mcr-1* gene in China[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018, 52(1): 14-21.

(本文责编 陈宏宇)