



研究报告

IncFII-FIA-FIB 型多重耐药质粒 pBTR-CTXM 的结构基因组学分析

李曼莉^{1,2} 王利君³ 赵亚超² 蒋昭芳² 周冬生² 童贻刚^{*2} 赵宝华^{*1}

1 河北师范大学生命科学学院 河北 石家庄 050024

2 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071

3 清华大学附属北京清华长庚医院 清华大学临床医学院 北京 102218

摘要:【背景】IncFII-FIA-FIB 型质粒广泛存在于肠杆菌科细菌中,介导了许多耐药基因的水平转移,并导致细菌多重耐药问题日益严重。【目的】分析 IncFII-FIA-FIB 型多重耐药质粒 pBTR-CTXM 的基因组结构,并研究其介导大肠杆菌 BTR 株的耐药基因水平转移机制。【方法】利用 PCR 进行耐药基因筛查;接合转移和电转化实验验证质粒 pBTR-CTXM 是否具备自主接合转移的特性;VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析仪测定相关菌株对抗生素的药物敏感性;构建 Mate Pair 文库并进行细菌全基因组高通量测序和质粒结构基因组学分析。【结果】菌株 BTR 是携带 *bla*_{NDM-1}、*bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{TEM}、*qnrD*、*qnrS1*、*mph*(A)、*erm*(B)和 *tetA*(B)等耐药基因的多重耐药大肠杆菌,其中 *bla*_{CTX-M-15}、*mph*(A)、*erm*(B)和 *tetA*(B)等耐药基因均位于大小为 144 939 bp 的质粒 pBTR-CTXM (GenBank 登录号 MF156697)上,该质粒可与菌株 BTR 内质粒 pNDM-BTR 接合共转移到受体菌大肠杆菌 EC600 中。pBTR-CTXM 具备 IncFII-FIA-FIB 型质粒典型的骨架区结构,其多重耐药(Multidrug-resistant, MDR)区由新的复合型转座子 Tn6492、Tn2 残余、Tn10 残余、ISEcp1-*bla*_{CTX-M-15}- Δ orf477 转座单元和一些插入序列组成。【结论】pBTR-CTXM 中新复合型转座子 Tn6492 与 Tn10 残余和 ISEcp1-*bla*_{CTX-M-15}- Δ orf477 转座单元共同介导大肠杆菌 BTR 株的多重耐药与耐药基因的水平传播。

关键词: 大肠杆菌, IncFII-FIA-FIB 型质粒, pBTR-CTXM, Tn6492, 多重耐药

Foundation item: Science and Technology Planning Project of Hebei Province (17226701D)

***Corresponding authors:** TONG Yi-Gang: Tel: 86-10-63869835; E-mail: tong.yigang@gmail.com

ZHAO Bao-Hua: Tel: 86-311-80789712; E-mail: zhaobaohua@hebtu.edu.cn

Received: 31-05-2018; **Accepted:** 27-07-2018; **Published online:** 10-08-2018

基金项目: 河北省科技计划项目(17226701D)

***通信作者:** 童贻刚: Tel: 010-63869835; E-mail: tong.yigang@gmail.com

赵宝华: Tel: 0311-80789712; E-mail: zhaobaohua@hebtu.edu.cn

收稿日期: 2018-05-31; **接受日期:** 2018-07-27; **网络首发日期:** 2018-08-10

Structural genomics of IncFII-FIA-FIB multidrug resistant plasmid pBTR-CTXM

LI Man-Li^{1,2} WANG Li-Jun³ ZHAO Ya-Chao² JIANG Zhao-Fang²
ZHOU Dong-Sheng² TONG Yi-Gang^{*2} ZHAO Bao-Hua^{*1}

1 College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050024, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China

3 Department of Laboratory Medicine, Beijing Tsinghua Chang Gung Hospital, Tsinghua University, Beijing 102218, China

Abstract: [Background] The IncFII-FIA-FIB incompatibility group plasmids are widely encountered in Enterobacteriaceae species. They mediate the horizontal transfer of many resistance genes and lead to the upsurge of multidrug-resistant strains. [Objective] To investigate the genomic characterization of the multidrug-resistant plasmid pBTR-CTXM assigned into IncFII-FIA-FIB incompatibility group and the plasmid-mediated horizontal transfer mechanism of resistance genes of *Escherichia coli* BTR. [Methods] The screening of antibiotic resistance genes was determined using PCR. The transferability of plasmid pBTR-CTXM was confirmed by conjugation experiments and electroporation experiments. The minimal inhibitory concentration (MIC) values were tested by VITEK 2 Compact system. The complete nucleotide sequence of pBTR-CTXM was determined using next-generation sequencing technology from a mate pair library. Structural genomics of pBTR-CTXM was analyzed subsequently. [Results] The multidrug-resistant *E. coli* BTR isolate harbored the *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM}, *qnrD*, *qnrS1*, *mph*(A), *erm*(B), and *tetA*(B) genes. The *bla*_{CTX-M-15}, *mph*(A), *erm*(B), and *tetA*(B) genes were located on pBTR-CTXM (GenBank accession number MF156697) with 144 939 bp in length. The pBTR-CTXM could be conjugatively mobilized to the recipient strain *E. coli* EC600 by pNDM-BTR, a conjugative plasmid existed in the *E. coli* BTR. pBTR-CTXM possessed typical backbones of IncFII-FIA-FIB plasmids and a multidrug-resistant (MDR) region, which was comprised of a novel composite transposon Tn6492, the Tn2 remnant, the Tn10 remnant, the *ISEcp1-bla*_{CTX-M-15}- Δ *orf477* unit and some insertion sequences (IS) elements. [Conclusion] The novel composite transposon Tn6492, the Tn10 remnant, and the *ISEcp1-bla*_{CTX-M-15}- Δ *orf477* unit mediated the horizontal transfer of resistance genes and the antibiotic resistance of *E. coli* BTR.

Keywords: *Escherichia coli*, IncFII-FIA-FIB plasmid, pBTR-CTXM, Tn6492, Multidrug resistance

随着抗菌药物的广泛使用,细菌的多重耐药问题越来越严峻,严重威胁着细菌感染性疾病的治疗。大肠杆菌作为医源性感染的常见条件致病菌之一,可引起尿道感染、新生儿脑膜炎、败血症等疾病^[1-2]。近年来,抗菌药物如第三代头孢菌素、喹诺酮类抗生素以及磺胺类药物已成为治疗大肠杆菌感染性疾病的主要选择^[1]。在抗菌药物的选择压力下,大肠杆菌的耐药表型也呈现多样化的趋势。而细菌获得耐药性的主要途径——质粒介导的耐药基因的水平传播,不仅造成了耐药基因在同种属细菌内的积聚,还加剧了不同种属间耐药基因的扩散^[3]。目前,大肠杆菌中已被发现有多种不相容群的质粒,如 IncN、IncK、IncB/O、IncI1 和 IncF 等^[3-5]。

IncF 型质粒是流行性耐药质粒,大小不一,宿主谱较窄,可以在大肠杆菌内稳定存在并广泛传播^[6-7]。IncF 质粒同时具备耐药特性和致病特性,通过携带抗生素抗性、毒素、重金属抗性和稀有物质代谢等相关基因,协助宿主抵抗外界不利因素,提高了细菌对周围环境的适应能力^[7]。IncF 型质粒分为 6 个亚群(IncFI、IncFII、IncFIII、IncFIV、IncFV 和 IncFVI),而且复制子类型多样。FII 型复制子常与其他不相容群复制子存在于同一个质粒中,形成质粒多复制子结构。IncFII-FIA-FIB 型质粒即是 IncF 型多复制子质粒,包括 FII 型复制子 RepFII、FIA 型复制子 RepFIA 和 FIB 型复制子 RepFIB^[8-9]。FII 型复制子最早发现于质粒 R100 (GenBank 登录

号 NC_002134)中^[10], FIA 型复制子和 FIB 型复制子最早发现于 F 质粒(GenBank 登录号 AP001918)中^[11]。当一个质粒中同时存在 FII 型复制子与 FIA 型或/和 FIB 型复制子时,FII 型复制子并不发挥复制的功能^[12]。

我们前期已对临床分离得到的一株多重耐药大肠杆菌 BTR 中 IncN1 型质粒 pNDM-BTR 进行了报道^[13], 阐明了质粒 pNDM-BTR 的结构特征。在此基础上, 本文对大肠杆菌 BTR 中另一个质粒 pBTR-CTXM 进行了接合转移能力和介导耐药表型的鉴定、全序结构的精细注释和结构基因组学的分析, 旨在进一步阐述大肠杆菌 BTR 的耐药机制, 并加深对 IncFII-FIA-FIB 型质粒介导耐药基因水平传播机制的理解。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

大肠杆菌 BTR 于 2013 年分离自北京同仁医院一名 89 岁慢性阻塞性肺疾病女性患者的尿液标本, 经 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析仪和 16S rRNA 基因测序鉴定^[14], 菌株 BTR 为大肠杆菌; 接合转移实验的受体菌是临床分离株大肠杆菌 EC600, 由解放军 302 医院惠赠; 电转化实验的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA Marker, 北京全式金有限公司; BHI 培养基, BD Biosciences 公司; SOB 培养基, 北京鼎国昌盛生物公司; 利福平, Sigma 公司; High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche 公司; QIAGEN

Plasmid Midi Kit, Qiagen 公司; Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega 公司; Nextera Mate Pair Sample Preparation Kit, Illumina 公司。MiSeq 测序仪, Illumina 公司; PCR 仪, ABI 公司; MicroPulser 电转化仪, Bio-Rad 公司。

1.2 耐药基因筛查

利用 High Pure PCR Template Preparation Kit 提取菌株 BTR 的基因组 DNA, 将其作为模板, 通过 PCR 筛查碳青霉烯酶耐药基因^[15]、超广谱 β -内酰胺酶 (Extended spectrum β -lactamase, ESBL) 耐药基因^[16]、喹诺酮类耐药基因^[17]、大环内酯类耐药基因^[18]和四环素类耐药基因^[19]。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 相应退火温度 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。将扩增产物进行 1% 浓度的琼脂糖凝胶电泳, 并利用一代测序验证扩增产物的序列。

1.3 接合转移实验

依据 pNDM-BTR 质粒接合转移的实验方法^[13], 将菌株 BTR (四环素耐药, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作为供体菌, 大肠杆菌 EC600 (利福平耐药, 2.5 mg/mL) 作为受体菌, 进行接合转移实验。混合 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养过夜的菌株 BTR 和受体菌 EC600, 5 000 r/min 离心 5 min 后用 80 μL 的 BHI 液体培养基重悬, 点加在贴于 BHI 平板的滤膜(1 cm^2 大小, 0.45 μm 孔径)上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12–18 h。再用含 2.5 mg/mL 利福平和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素的 BHI 液体培养基洗脱菌体, 涂布于含有 2.5 mg/mL 利福平和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素的 BHI 固体培养基上。37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24–48 h 后, 挑取单菌落, 通过 PCR (引物见表 1) 和一代测序检

表 1 耐药基因扩增引物序列信息

Table 1 The PCR primers used for antimicrobial resistance gene amplifications

引物 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	产物长度 Amplicon size (bp)	退火温度 PCR annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)
NDM-1-F	GGTTTGCGATCTGGTTTTC	621 ^[15]	56
NDM-1-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		
CTX-M-15-F	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	415 ^[16]	52
CTX-M-15-R	AGCTTATTCATCGCCACGTT		
qnrS1-F	GCAAGTTTCATTGAACAGGGT	427 ^[17]	57
qnrS1-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
tetA(B)-F	CCTTATCATGCCAGTCTTGC	774 ^[19]	57
tetA(B)-R	ACTGCCGTTTTTTCGCC		

测菌株 BTR 相应的耐药基因是否存在于接合子 (BTR-CTXM-EC600) 中。

1.4 电转化实验

利用 QIAGEN Plasmid Midi Kit 提取菌株 BTR 中的质粒 DNA, 取大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞进行电击转化, 之后向电击杯中迅速加入 1 mL 的 SOB 液体培养基, 重悬细胞后转移到 1.5 mL 的离心管中。37 °C、200 r/min 复苏培养菌体 2 h。将复苏后的菌体涂布到含四环素(20 μ g/mL)的 SOB 固体培养基上, 37 °C 培养 24 h。挑取单菌落, 利用 PCR (引物见表 1) 和一代测序检测电转子(BTR-CTXM-DH5 α) 中是否存在菌株 BTR 相应的耐药基因。

1.5 药敏实验

用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析仪测定菌株 BTR、接合子 BTR-CTXM-EC600、受体菌 EC600、电转子 BTR-CTXM-DH5 α 和受体菌 DH5 α 对抗生素的最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)。该试验结果按照美国临床与实验室标准协会(CLSI, 2017)标准^[20]判读。

1.6 全基因组测序及生物信息学分析

利用 Wizard Genomic DNA Purification Kit 提取菌株 BTR 的基因组。构建 Mate Pair 文库, 采用二代高通量测序平台进行全基因组测序。过滤低质量数据后, 使用 Newbler 3.0^[21] 软件进行序列拼接构建 Contigs 和 Scaffolds, 然后利用 PCR 和 Sanger 双脱

氧链终止法测序技术对 Contigs 间的缺失部分进行补充, 最终得到质粒的全序列。

质粒序列中的开放阅读框用 RAST^[22] 进行预测, 并通过 BLASTN/BLASTP^[23] 与 RefSeq^[24] 和 UniProt-KB/Swiss-Prot^[25] 等数据库比对分析进行注释。利用 ISFinder^[26]、INTEGRALL^[27] 和 Tn Number Registry^[28] 注释移动元件。使用 Inkscape V0.48.1 软件绘制质粒的结构图。

1.7 序列登录号

将 pBTR-CTXM 全序列提交至 GenBank, 获得登录号为 MF156697。

2 结果与分析

2.1 菌株耐药基因筛查

PCR 筛查耐药基因结果显示菌株 BTR 携带碳青霉烯酶基因 *bla*_{NDM-1}, 超广谱 β -内酰胺类耐药基因 *bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{TEM}, 喹诺酮类耐药基因 *qnrD*、*qnrS1*, 大环内酯类耐药基因 *mphA*(A)、*erm*(B), 以及四环素类耐药基因 *tetA*(B) 等。

2.2 接合转移和电转化实验

多次接合转移实验发现耐药基因 *bla*_{NDM-1} 和 *qnrS1* 与 *bla*_{CTX-M-15} 和 *tetA*(B) 共转移到接合子 BTR-CTXM-EC600 中(图 1)。但前期分析已经证实耐药基因 *bla*_{NDM-1} 和 *qnrS1* 由可自主接合转移的质粒 pNDM-BTR 携带, 而且在接合子 BTR-NDM-EC600^[13] 中 PCR 扩增 *bla*_{CTX-M-15} 和 *tetA*(B) 为阴性。

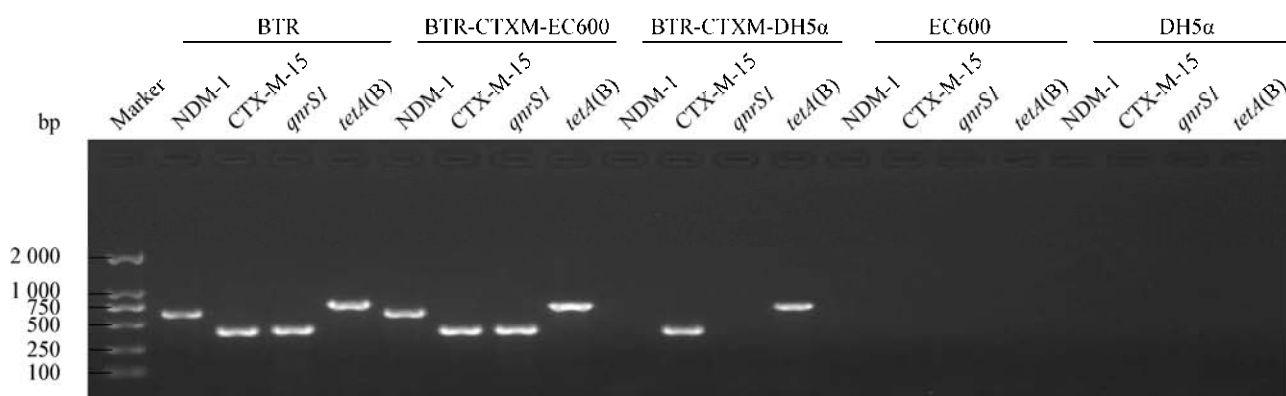


图 1 耐药基因 *bla*_{NDM-1}、*bla*_{CTX-M-15}、*qnrS1* 和 *tetA*(B) 的 PCR 扩增结果

Figure 1 PCR detection of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *qnrS1*, and *tetA*(B)

为检测耐药基因 *bla*_{CTX-M-15} 和 *tetA*(B) 是否存于另一个质粒中, 进行电转化实验, 发现 *bla*_{CTX-M-15} 和 *tetA*(B) 可转移到电转子 BTR-CTXM-DH5 α 中, 而且 PCR 扩增 *bla*_{NDM-1} 和 *qnrS1* 为阴性(图 1)。将携带 *bla*_{CTX-M-15} 和 *tetA*(B) 的质粒命名为 pBTR-CTXM。

2.3 药敏实验结果

大肠杆菌 BTR 及相关菌株的 MIC 检测结果表明菌株 BTR 对硝基呋喃类以外的抗生素均耐药, 而电转子 BTR-CTXM-DH5 α 对头孢唑啉、头孢呋辛、头孢呋辛酯、头孢曲松、氨苄西林、哌拉西林、氨曲南、四环素和阿奇霉素耐药(表 2)。

表 2 药物敏感性测定结果

Table 2 Antimicrobial drug susceptibility profiles (MIC (mg/L)/antimicrobial susceptibility)

分类 Category	抗生素 Antibiotics	BTR	BTR-CTXM-EC600	BTR-CTXM-DH5 α	EC600	DH5 α
单环 β -内酰胺类 Monobactam	氨曲南 Aztreonam	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\geq 16/R$	$\leq 1/S$	$\leq 1/S$
	四环素类 Tetracycline	$\geq 32/R$	$\geq 32/R$	$\geq 32/R$	$\leq 1/S$	$\leq 1/S$
大环内酯类 Macrolide	阿奇霉素 Azithromycin	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\leq 2/S$	$\leq 2/S$
	头孢菌素类 Cephalosporins	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\leq 4/S$	$\leq 4/S$
青霉素类 Penicillins	头孢唑啉 Cefazolin	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	16/I	4/S
	头孢呋辛 Cefuroxime	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	16/I	4/S
	头孢呋辛酯 Cefuroxime axetil	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\leq 1/S$	$\leq 1/S$
	头孢曲松 Ceftriaxone	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\leq 1/S$	$\leq 1/S$
	头孢吡肟 Cefepime	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	2/I	$\leq 1/S$	$\leq 1/S$
	头孢他啶 Ceftazidime	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	4/S	$\leq 1/S$	$\leq 1/S$
	头孢替坦 Ceftazidime	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\leq 4/S$	$\leq 4/S$	$\leq 4/S$
	Cefotetan	$\geq 64/R$	$\geq 64/R$	$\leq 4/S$	$\leq 4/S$	$\leq 4/S$
	氨苄西林 Ampicillin	$\geq 32/R$	$\geq 32/R$	$\geq 32/R$	16/I	$\leq 2/S$
	哌拉西林 Piperacillin	$\geq 128/R$	$\geq 128/R$	$\geq 128/R$	$\leq 4/S$	$\leq 4/S$
	氨苄西林/舒巴坦 Ampicillin/Sulbactam	$\geq 32/R$	$\geq 32/R$	4/S	8/S	$\leq 2/S$
	哌拉西林/他唑巴坦 Piperacillin/Tazobactam	$\geq 128/R$	$\geq 128/R$	$\leq 4/S$	$\leq 4/S$	$\leq 4/S$
	庆大霉素 Gentamicin	$\geq 16/R$	$\geq 16/R$	8/I	$\leq 1/S$	$\leq 1/S$
	氨基糖苷类 Aminoglycoside	$\geq 16/R$	$\geq 16/R$	$\leq 1/S$	$\leq 1/S$	$\leq 1/S$
	碳青霉烯类 Carbapenems	Imipenem	$\geq 16/R$	$\leq 0.25/S$	$\leq 0.25/S$	$\leq 0.25/S$
叶酸抑制剂类 Folate pathway inhibitor	美罗培南 Meropenem	$\geq 16/R$	8/R	$\leq 0.25/S$	$\leq 0.25/S$	$\leq 0.25/S$
	甲氧苄啶/磺胺甲噁 Trimethoprim/Sulfamethoxazole	$\geq 320/R$	$\geq 320/R$	$\leq 20/S$	$\leq 20/S$	$\leq 20/S$
喹诺酮类 Fluoroquinolone	环丙沙星 Ciprofloxacin	$\geq 64/R$	4/R	$\leq 0.25/S$	$\leq 0.25/S$	$\leq 0.25/S$
	硝基呋喃类 Nitrofurantoin	$\leq 16/S$	$\leq 16/S$	$\leq 16/S$	$\leq 16/S$	$\leq 16/S$

注: S: 敏感; I: 中介; R: 耐药。

Note: S: Susceptible; I: Intermediate; R: Resistant.

2.4 全基因组测序及生物信息学分析

2.4.1 质粒基本特征

pBTR-CTXM 是全长 144 939 bp 的环状 DNA 分子, 平均(G+C)mol% 含量为 51.85%, 存在 208 个编码蛋白的开放阅读框(表 3)。pBTR-CTXM 含有 3 个复制子 RepFII、RepFIA 和 RepFIB, 属于 IncFII-FIA-FIB 型质粒。纳入分析的质粒共 3 个: 第一个完整测序的 IncFII-FIA-FIB 型质粒 pRSB107^[9] (GenBank 登录号为 AJ851089); pBTR-CTXM (本文); 与 pBTR-CTXM 覆盖度、核酸一致性最高(86%+99%)的质粒 pRSB225 (GenBank 登录号 JX127248)^[29]。根据基因编码蛋白质的功能差异, 这些质粒均可分为骨架区和外源插入区(图 2)。每个质粒的外源插入区均包括一个 MDR 区、*ugp* 操纵子、*iucABCD-iutA* 基因簇和一些

分散的插入序列等(表 3)。

2.4.2 质粒骨架区分析

通过比对 pRSB107、pBTR-CTXM 和 pRSB225 的骨架区, 发现在>58%的覆盖度上存在高于 99% 的核酸一致性。3 个质粒的骨架区主要包括 3 类复制基因(*repA2-6-1-4*、*repE* 和 *repA*)、质粒稳定相关基因(*ccdAB*、*resD*、*parAB* 和 *pemIK* 等)和接合转移相关基因(*traIO* 和 *finO* 等) (图 3)。

在骨架区中, 3 个质粒之间的差异主要有: (1) pBTR-CTXM 的 FII 型复制子中 *repA4* 基因与其它质粒的该基因一致性仅有 91%。由于 IS100kyp 的插入, pBTR-CTXM 的 *repA2* 基因被打断成两部分, 即 *repA2-5'*和 *repA2-3'* (图 3A)。(2) *parC* 是 *parB* 的结合位点, 在 pRSB107 和 pRSB225 中为 432 bp,

表 3 质粒的主要特征
Table 3 Major features of plasmids analyzed

特征 Features	质粒 Plasmids		
	pRSB107	pBTR-CTXM	pRSB225
全序长度 Total length (bp)	120 592	144 939	164 550
平均(G+C)mol% 含量 Mean (G+C)mol% content	53.10	51.85	52.60
开放阅读框总数 Total number of ORFs	173	208	230
外源插入区 Accessory modules	The MDR region	The MDR region	The MDR region
	The <i>ugp</i> operon	The <i>ugp</i> operon	The <i>ugp</i> operon
	The <i>iucABCD-iutA</i> cluster	The <i>iucABCD-iutA</i> cluster	The <i>iucABCD-iutA</i> cluster
	IS26	IS26	IS26
	IS1A	IS1A	IS1A
	ΔIS640	ΔIS640	ΔIS640
	ΔISEc13	ΔISEc13	ΔISEc13
	ISEc23	IS1F	ISEc23
	ΔIS1203	ΔIS629	ΔIS1203
		IS150	IS150
		The <i>sitABCD</i> operon	The <i>sitABCD</i> operon
		IS100kyp	IS1X2
			ΔISKpn26

注: pBTR-CTXM 为本文测序质粒, pRSB107 和 pRSB225 来自于 GenBank.
Note: pBTR-CTXM was fully sequenced in this work, while pRSB107 and pRSB225 were derived from GenBank.

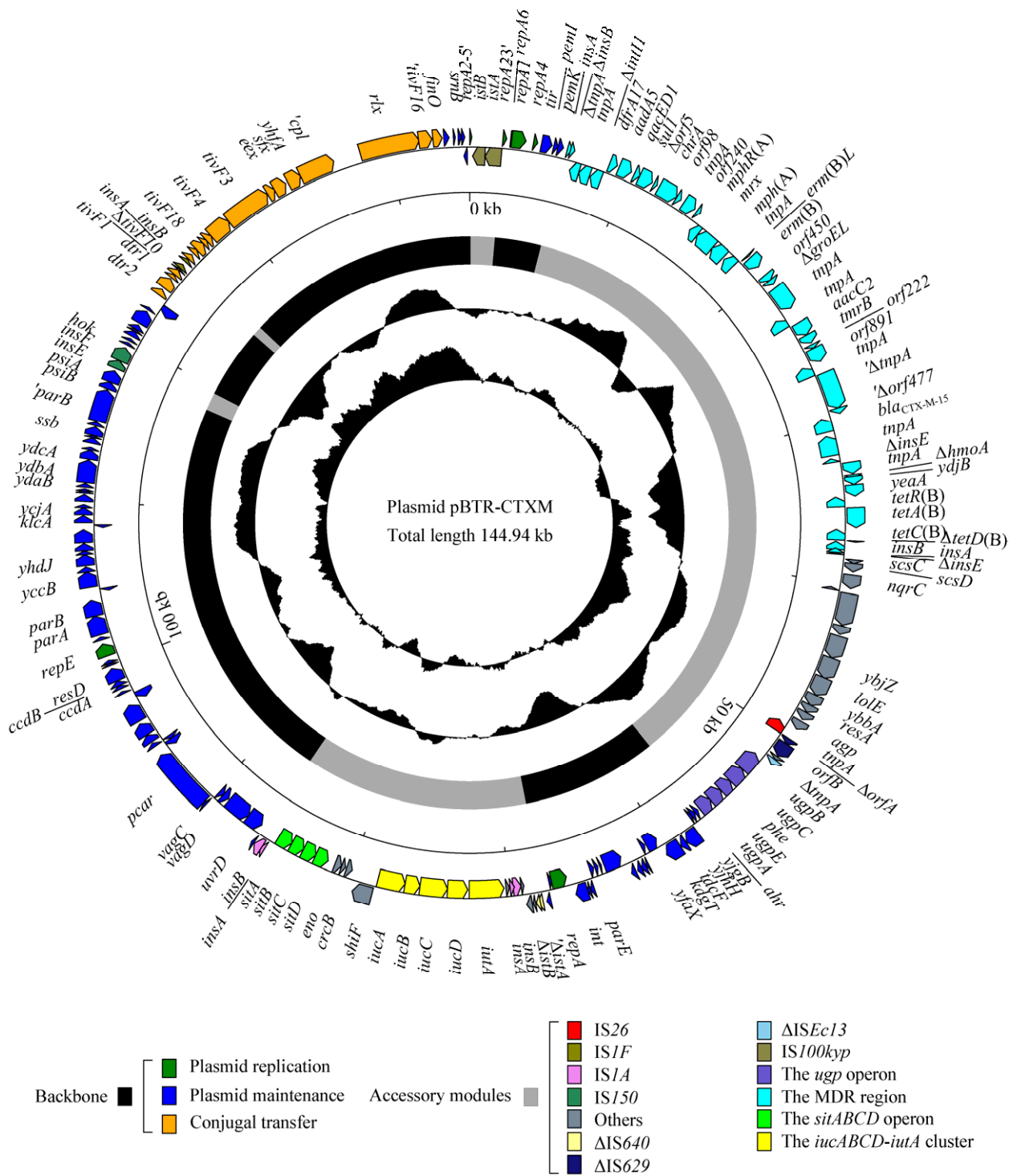


图 2 质粒 pBTR-CTXM 全序列示意图

Figure 2 Schematic map of pBTR-CTXM

注: 基因按功能用不同颜色的箭头表示; 图中最内环表示 GC 偏移量[(G-C)/(G+C)]; 次内环表示 GC 含量; 质粒骨架区和外源插入区分别用黑色区和灰色区表示。

Note: Genes are denoted by arrows and colored based on gene function classification. The innermost two circles present GC-skew [(G-C)/(G+C)] and GC contents. The backbone and accessory module regions are highlighted in black and gray, respectively.

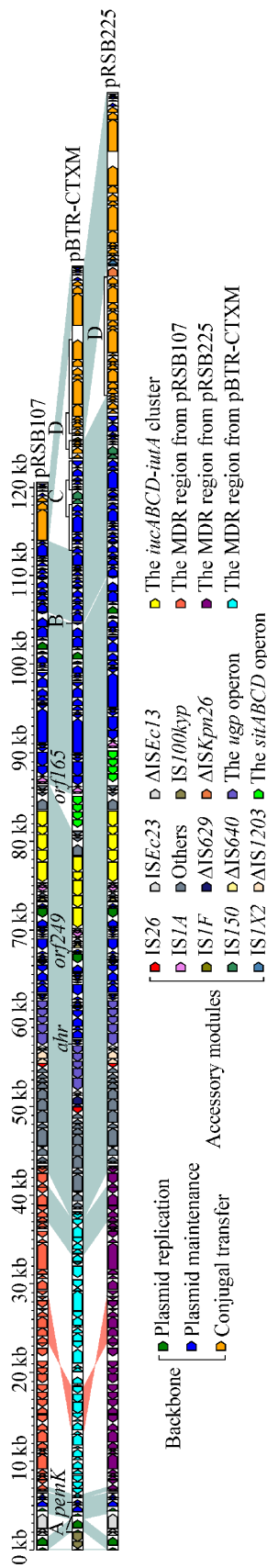


图 3 pRSB107、pBTR-CTXM 和 pRSB225 全序线性结构对比图
Figure 3 Linear comparison of pRSB107, pBTR-CTXM and pRSB225

注：基因用箭头表示；基因、移动元件和其他区域按功能用不同颜色表示；阴影部分表示区域核苷酸一致性大于 95%。
Note: Genes are denoted by arrows. Genes, mobile elements, and other features are colored based on function classification. Shading denotes regions of homology (>95% nucleotide identity).

而 pBTR-CTXM 的 *parC* 只剩下 302 bp (7 个 43–44 bp 串联重复单元: GGGTCTGATTATTAGTCTGGGACCACGGTCCCACTCGTATCGTC) (图 3B)。(3) 与 pRSB107 相比, pBTR-CTXM 和 pRSB225 在 *ydbA* 与 *dtr2* 之间插入了一段与质粒稳定相关的序列(图 3C)。(4) 3 个质粒的接合转移区长度不同: pRSB107 的接合转移区仅含有 3 个基因(*rlx*、*tivF16* 和 *finO*), 而且不具备自主接合转移的能力^[9]; pRSB225 的接合转移区由 *dtr1*、*dtr2*、*tivF1–tivF16*、*tivF18*、*tivF19*、*eex*、*sfx*、*yhfA*、*cpl*、*rlx* 和 *finO* 构成, 可以进行自主接合转移^[29]; pBTR-CTXM 的接合转移区由于 *IS1F* 的插入, 导致 *tivF10* 基因被截短。与 pRSB225 相比, pBTR-CTXM 缺少部分与 IV 型分泌系统相关的基因(*tivF2*、*tivF5–tivF9*、*tivF11–tivF15* 和 *tivF19*) (图 3D), 可能是其不能自主接合转移的原因。

2.4.3 质粒 MDR 区分析

pRSB107/pRSB225 的 MDR 区(36 817 bp)由复合型转座子 Tn6491 (本文新命名)、Tn10 残余和 *IS1R* 组成。pBTR-CTXM 的 MDR 区(32 439 bp)由新的复合型转座子 Tn6492、Tn10 残余、Tn2 残余、*ISEcp1-bla_{CTX-M-15}-Δorf477* 转座单元和一些插入序列组成(图 4)。

Tn21 是 Tn3 家族的转座子, 结构为 IRL (Inverted repeat left, 左反向重复序列)-*tnpA* (Transposase, 转座酶)-*tnpR* (Resolvase, 解离酶)-*res* (Resolution site, 重组位点)-*tnpM* (Modulator protein, 调节蛋白)-*In2-urf2-merEDACPTR* (Mercuric resistance locus, 汞耐药位点)-IRR (Inverted repeat right, 右反向重复序列), 两端分别有 5 bp 的正向重复序列(Direct repeat, DR)。Tn2670 最初在 R100 中被发现, 是由 Tn21 插入到一个 Tn9-like 转座子的 *IS1R* 与 *ybjA* 中间形成的复合型转座子, 两端被 9 bp 的 DRs 所包围^[30]。由于一系列的转座和 *IS26* 或 *IS6100* 介导的同源重组事件, Tn4352、Tn6029、转座单元 *IS26-mph(A)-mrx-mphR(A)-IS6100* 和 In191 替代了 Tn2670 中 In2 的 *tniA-3'-tniBD1-IS1353-IS1326-orf5-sull-qacED1-aadA1* 的位置, 形成了 Tn6491。Tn4352

是一个复合型转座子, 以两个方向相同的 *IS26* 为基础, 携带了 *aphA1a* (Aminoglycoside resistance: 氨基糖苷类耐药)基因。复合型转座子 Tn6029 是由 *IS26*、Tn2 和 Tn5393c 通过同源重组产生, 包括 *sul2* (Sulphonamide resistance: 磺胺类耐药)、*strAB* (Streptomycin resistance: 链霉素耐药)和 *bla_{TEM-1}* (Beta-lactamase resistance: β-内酰胺类耐药)耐药基因, 以及 3 个 *IS26*^[31]。*IS26-mph(A)-mrx-mphR(A)-IS6100* 转座单元作为典型的大环内酯转座单元^[32], 在 Tn6491 中为完整的结构。Tn402-associated 1 型整合子原型的结构为 IRi (Inverted repeat at the integrase end, 位于整合酶末端的反向重复序列)、5'保守区 (5'-Conserved segment, 5'CS)的整合酶(Integrase, *intI1*)和重组位点(*attI1*)、基因盒阵列, 3'保守区 [3'-Conserved segment, 3'CS: *qacED1* (Quaternary ammonium compound resistance: 季铵复合物耐药)、*sull*、*orf5* 和 *orf6*]、Tn402 的 *tni* 模块和 IRt (Inverted repeat at the *tni* end, 位于 *tni* 模块末端的反向重复序列), 而且两端被 5 bp 的 DRs 所包围。In191 是 Tn402-associated 1 型整合子原型的衍生物, 结构为 IRi-*intI1-dfrA14* (Trimethoprim resistance: 甲氧苄啶耐药)-*mobC-IRt-IS6100*, 但与之相比丢失了 3'保守区和 *tni* 模块。

Tn10 是复合型转座子, 首尾是方向相反的插入序列 *IS10*, 中间携带着 *tetD(B)*、*tetC(B)*、*tetA(B)* (Tetracycline resistance: 四环素类耐药)、*tetR(B)*、*yeaA*、*ydjB*、*hmoA* 和 *ydhA*, 两端由 9 bp 的 DRs 包围^[33]。在 pRSB107 和 pRSB225 中, 因为 Tn2670 的插入, 导致 Tn10 中左手端 *IS10*、*ydhA* 和 *hmoA-5'* 的缺失, 并且 *IS1R* 插入到右手端 *IS10* 中, 将 *insE* 打断成两部分, 即 *insE-5'* 和 *insE-3'*。在 pBTR-CTXM 中, Tn10 只剩下 *tetD(B)-5'*、*tetC(B)*、*tetA(B)*、*tetR(B)*、*yeaA*、*ydjB* 和 *hmoA-3'*。

Tn6492 由 *IS26*、In54、*chrA* (Chromate resistance: 铬酸盐耐药基因)-*orf98* 转座单元、大环内酯转座单元 *IS26-mph(A)-mrx-mphR(A)-IS6100*、ΔTn6295 和 Tn6415 组成, 两端被 8 bp 的 DRs 包围。In54 属于

Tn402-associated 1 型整合子,携带 *dhfr17* (Trimethoprim resistance: 甲氧苄啶耐药)和 *aadA5* (Aminoglycoside resistance: 氨基糖苷类耐药)两个基因盒。*chrA-orf98* 转座单元可能来源于 pCNB1 (GenBank 登录号为 EF079106)中一个 Tn21-like 的转座子,经常和 IRt-IS6100 紧密相连^[32]。Tn6295 是由首尾为同向的 IS26、大环内酯操纵子 *erm(B)*L-*erm(B)*、*orf450*、 Δ *groEL* 和 ISCR3 组成的复合型转座子。Tn6415 最早发现于大肠杆菌 AR_0119 中的质粒 Unitig_2 (GenBank 登录号为 CP021536)中,整体结构为 IS26-*aacC2* (Aminoglycoside resistance: 氨基糖苷类耐药)-*tmrB-orf222-orf891*-IS26, 两端由 8 bp 的 DRs 包围。在 Tn6492 中, In54 的整合酶和 *orf5* 被截短且丢失了 *orf6* 和 *tmi* 模块,其下游的 *chrA-orf98* 转座单元结构完整,而且紧连完整的大环内酯转座单元 IS26-*mph(A)*-*mrx-mphR(A)*-IS6100。Tn6295 与大环内酯转座单元 IS26-*mph(A)*-*mrx-mphR(A)*-IS6100 发生了 IS26 介导的同源重组事件,而且 Tn6295 中 ISCR3 的 *oriIS* 和右手端的 IS26 被下游结构完整的 Tn6415 截短。

ISEcp1-*bla*_{CTX-M-15}- Δ *orf477* 转座单元是常见介导 *bla*_{CTX-M-15} (Beta-lactamase resistance: β -内酰胺类耐药)转移的移动元件,两端被 5 bp 的 DRs 所包围。ISEcp1 是单末端插入序列,可以仅靠单个插入序列识别其自身的反向重复序列(IR: Inverted repeat)以及与 IRR-1 相似度较高的 IRR-2,介导邻近耐药基因的转移^[34]。Tn2 是 Tn3 家族转座子,基本组成为 IRL-*tnpA-res-tnpR*-*bla*_{TEM-1}-IRR,两端被 5 bp 的 DRs 所包围^[35]。在 pBTR-CTXM 中,Tn2 被 ISEcp1-*bla*_{CTX-M-15}- Δ *orf477* 转座单元截短,剩余 2 838 bp (只包括 IRL 和 Δ *tnpA*),而且由于 Tn6492 的插入, Δ *tnpA* 被截成两部分。

3 讨论与结论

质粒 pBTR-CTXM 通过携带 *bla*_{CTX-M-15}、*mph(A)*、*erm(B)*和 *tetA(B)*等耐药基因,介导了大肠杆菌 BTR 和电转子 BTR-CTXM-DH5 α 对单环 β -内酰胺类、部分头孢菌素类、青霉素类(不含酶抑制

剂)、大环内酯类和四环素类等抗生素的耐药性。pBTR-CTXM 具有 IncFII-FIA-FIB 型质粒典型的骨架区结构,可能由于接合转移区缺少部分基因,需要在另一个质粒 pNDM-BTR 的协助下共转移到受体菌 EC600 中,但可通过电转化进入受体菌大肠杆菌 DH5 α 中,属于可移动质粒。pBTR-CTXM 的 MDR 区是由许多不同移动元件组成的复杂的“马赛克”结构,包含了 pBTR-CTXM 的全部耐药基因。IS26、In54、*chrA-orf98* 转座单元、IS26-*mph(A)*-*mrx-mphR(A)*-IS6100 转座单元、 Δ Tn6295 和 Tn6415 通过复杂的转座和同源重组事件形成了一个新的复合型转座子 Tn6492。pRSB107、pBTR-CTXM 和 pRSB225 的骨架区中存在两个插入“热点”,即 *pemK* 和 *ahr* 之间与 *orf249* 和 *orf165* 之间(图 3),可整合不同的外源序列,尤其是含有耐药基因的移动元件,从而促进了耐药基因在不同种属细菌间的水平传播。

本文通过对 IncFII-FIA-FIB 型多重耐药质粒 pBTR-CTXM 进行结构基因组学分析,进一步明确了大肠杆菌 BTR 对单环 β -内酰胺类、大环内酯类和四环素类等多种抗生素的耐药机制,加深了对 IncFII-FIA-FIB 型质粒介导的耐药基因水平传播机制的理解,并为感染性疾病的规范化用药和研制新型抗菌药物提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2013, 10(11): 916-932
- [2] Liu CY. Comparative genomics analysis and study on subunit vaccine of porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2014 (in Chinese)
刘璨颖. 猪源肠外致病性大肠杆菌比较基因组学和亚单位疫苗的研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2014
- [3] Bengtsson S, Naseer U, Sundsfjord A, et al. Sequence types and plasmid carriage of uropathogenic *Escherichia coli* devoid of phenotypically detectable resistance[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(1): 69-73
- [4] Hammerum AM, Larsen J, Andersen VD, et al. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(10): 2650-2657

- [5] Duan SS. The dissemination mechanism and genetic characteristics of CTX-M clusters among Avian *Escherichia coli*[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2015 (in Chinese)
段沙沙. 禽大肠埃希菌不同 CTX-M 亚群的散播机制及遗传特性[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2015
- [6] Marcadé G, Deschamps C, Boyd A, et al. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009, 63(1): 67-71
- [7] Villa L, García-Fernández A, Fortini D, et al. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65(12): 2518-2529
- [8] Osborn AM, da Silva Tatley FM, Steyn LM, et al. Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons[J]. Microbiology, 2000, 146(9): 2267-2275
- [9] Szczepanowski R, Braun S, Riedel V, et al. The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions[J]. Microbiology, 2005, 151(4): 1095-1111
- [10] Womble DD, Rownd RH. Genetic and physical map of plasmid NR1: comparison with other IncFII antibiotic resistance plasmids[J]. Microbiological Reviews, 1988, 52(4): 433-451
- [11] Cavalli LL, Lederberg J, Lederberg EM. An infective factor controlling sex compatibility in *Bacterium coli*[J]. Microbiology, 1953, 8(1): 89-103
- [12] Zhan Z, Feng J, Yin Z, et al. Antibiotic-resistant mechanisms of plasmid pA1137 carrying aminoglycoside resistance gene *aacC2*[J]. Military Medical Sciences, 2017, 41(12): 973-977 (in Chinese)
占喆, 冯娇, 殷喆, 等. 携带氨基糖苷类耐药基因 *aacC2* 的质粒 pA1137 耐药机制研究[J]. 军事医学, 2017, 41(12): 973-977
- [13] Zhao YC, Wang LJ, Zhang ZY, et al. Structural genomics of pNDM-BTR harboring *In191* and *Tn6360*, and other *bla*_{NDM}-carrying IncN1 plasmids[J]. Future Microbiology, 2017, 12(14): 1271-1281
- [14] Frank JA, Reich CI, Sharma S, et al. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(8): 2461-2470
- [15] Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2011, 70(1): 119-123
- [16] Dallenne C, Da Costa A, Decré D, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65(3): 490-495
- [17] Ciesielczuk H, Hornsey M, Choi V, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance determinants[J]. Journal of Medical Microbiology, 2013, 62(12): 1823-1827
- [18] Phuc Nguyen MC, Woerther PL, Bouvet M, et al. *Escherichia coli* as reservoir for macrolide resistance genes[J]. Emerging Infectious Diseases, 2009, 15(10): 1648-1650
- [19] Maynard C, Fairbrother JM, Bekal S, et al. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(10): 3214-3221
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S27 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-seventh informational supplement[Z]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2017
- [21] Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. Nature, 2005, 437(7057): 376-380
- [22] Aziz RK, Bartels D, Best AA, et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology[J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 75
- [23] Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, et al. BLAST: a more efficient report with usability improvements[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41: W29-W33
- [24] O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(D1): D733-D745
- [25] Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, et al. UniProtKB/Swiss-Prot, the manually annotated section of the UniProt KnowledgeBase: how to use the entry view[A]//Plant Bioinformatics. Methods in Molecular Biology[M]. New York: Humana Press, 2016: 23-54
- [26] Siguier P, Perochon J, Lestrade L, et al. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(suppl 1): D32-D36
- [27] Moura A, Soares M, Pereira C, et al. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes[J]. Bioinformatics, 2009, 25(8): 1096-1098
- [28] Roberts AP, Chandler M, Courvalin P, et al. Revised nomenclature for transposable genetic elements[J]. Plasmid, 2008, 60(3): 167-173
- [29] Wibberg D, Szczepanowski R, Eikmeyer F, et al. The IncF plasmid pRSB225 isolated from a municipal wastewater treatment plant's on-site preflooder combining antibiotic resistance and putative virulence functions is highly related to virulence plasmids identified in pathogenic *E. coli* isolates[J]. Plasmid, 2013, 69(2): 127-137
- [30] Partridge SR, Hall RM. Complex multiple antibiotic and mercury resistance region derived from the r-det of NR1 (R100)[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(11): 4250-4255
- [31] Cain AK, Liu XL, Djordjevic SP, et al. Transposons related to *Tn1696* in IncHI2 plasmids in multiply antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium from Australian animals[J]. Microbial Drug Resistance, 2010, 16(3): 197-202
- [32] Chalmers R, Sewitz S, Lipkow K, et al. Complete nucleotide sequence of *Tn10*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(10): 2970-2972
- [33] Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2011, 35(5): 820-855
- [34] Zong ZY, Partridge SR, Iredell JR. *ISEcp1*-mediated transposition and homologous recombination can explain the context of *bla*_{CTX-M-62} linked to *qnrB2*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(7): 3039-3042
- [35] Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, et al. Distribution of the *bla*_{TEM} gene and *bla*_{TEM}-containing transposons in commensal *Escherichia coli*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 66(4): 745-751