

mcr-1 阳性类噬菌体质粒与 F33:A-:B-质粒共整合形成的融合质粒的生物学特性分析

王亮亮¹, 王倩倩¹, 朱莹莹¹, 庞子峰¹, 朱玉喜¹, 植婵萍², 潘玉善¹, 刘建华¹, 贺丹丹^{1*}

(1. 河南农业大学, 河南 郑州 450000; 2. 广东茂名农林科技职业学院, 广东 茂名 525000)

摘要: 为了分析猪源大肠杆菌中 *mcr-1* 阳性不可接合类噬菌体质粒 pD72-*mcr-1* 与 *bla*_{CTX-M-55} 阳性可接合的 F33:A-:B-质粒 pD72-F33 融合形成的共整合质粒 pD72C 的生物学特性, 评估该融合质粒对 *mcr-1* 传播的潜在作用, 本实验采用生长曲线测定、质粒稳定性实验、竞争性实验和接合实验, 测定了融合质粒 pD72C 和亲本质粒 pD72-F33 对宿主菌的适应性、融合能力和扩散能力。结果表明: 融合质粒 pD72C 在无抗生素的环境中能稳定传代 9 d, 对宿主菌有适应性优势, 且比亲本质粒 pD72-F33 具有更好的竞争优势; 该融合质粒表现出较高的融合频率和接合频率, 说明该融合质粒能够扩展菌株的耐药谱并促进粘菌素耐药基因 *mcr-1* 的传播。

关键词: 共整合质粒; *mcr-1*; 质粒稳定性; 适应性代价; 融合频率

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 1001-8581(2021)04-0103-05

Biological Characteristics of Co-integrated Plasmid Derived from *mcr-1*-positive-phage-like Plasmid and F33:A-:B-Plasmid

WANG Liang-liang¹, WANG Qian-qian¹, ZHU Ying-ying¹, PANG Zi-feng¹, ZHU Yu-xi¹,
ZHI Chan-ping², PAN Yu-shan¹, LIU Jian-hua¹, HE Dan-dan^{1*}

(1. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China;

2. Guangdong Maoming Agriculture and Forestry Technical College, Maoming 525000, China)

Abstract: In order to analyze the biological characteristics of the co-integrated plasmid pD72C formed by the fusion of non-conjugative *mcr-1*-positive-phage-like plasmid pD72-*mcr-1* and conjugative *bla*_{CTX-M-55} positive IncF33:A-:B-plasmid pD72-F33 and evaluate the potential role of the fusion plasmid in *mcr-1* transmission, the growth curve test, plasmid stability test, competition experiment, conjugation assay were used to determinate the fitness, fusion and diffusion potentiality of the co-integrated pD72C and the parental plasmid pD72-F33. The results showed that the fusion plasmid remained stable for 9 days of passage in an antibiotic-free environment, presented a adaptive advantage for its host, and showed higher fitness than the parental plasmid pD72-F33. Moreover, the fusion plasmid exhibited the relatively high fusion frequency and conjugation frequency. Fusion plasmids can expand the drug resistance spectrum of strains and promote the transmission of drug resistance gene *mcr-1*.

Key words: Co-integrated plasmid; *mcr-1*; Stability of plasmid; Fitness; Fusion frequency

F33:A-:B-型质粒是多重耐药质粒 IncF 型质粒中最为流行的亚型之一, 它广泛存在于肠杆菌科细菌, 尤其是大肠杆菌中, 是介导 *fosA3*、*bla*_{CTX-M₅} 和 *rmtB* 等耐药基因快速传播的主要载体^[1-3]。F33:A-:B-型质粒除了能够借助 IS26 和 IS1294 元件捕获和传播抗性基因外, 还能够获得 IncN1、IncI1、IncR 和 IncX1 型质粒的一些片段成为多复制子质粒^[3]。本课题组在研究猪源大肠杆菌中 *mcr-1* 的水平转移能力时, 首次发现在接合过程中, F33:A-:B-型质粒 pD72-F33 捕获了大约 96

kb 的 *mcr-1* 阳性类噬菌体质粒 pD72-*mcr-1* 形成融合质粒 pD72C; 序列分析发现, 其质粒融合机制是 pD72-F33 上 1 个拷贝的 IS26 攻击 pD72-*mcr-1* 上 8 bp 的目标位点 (CAGCATT)^[4]。

质粒介导的粘菌素耐药基因 *mcr-1* 已经成为全球关注的重点。自 2015 年 *mcr-1* 被首次报道后, 该基因在世界范围内不同来源的不同菌种中广泛出现^[5-7]。不同的 *mcr-1* 阳性不相容群质粒不断被报道, 尤其是较流行的 IncI2、IncX4 和 IncHI2 型质粒, 它们所具有的较高的稳定性和适

收稿日期: 2020-08-18

(基金项目: 国家自然科学基金项目(31702295)) Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net
作者简介: 王亮亮(1997-), 男, 河南周口人, 硕士, 从事兽医药理毒理学研究。* 通信作者: 贺丹丹。

应性优势对 *mcr-1* 的快速传播起到重要作用^[8-10]。除了可接合性质粒, *Tn6330* (*ISAp11-mcr-1-ISAp11*) 与 *mcr-1* 的快速传播密切相关, *Tn6330* 能够通过形成环形中间体形式促使 *mcr-1* 插入到其它细菌的染色体或质粒的 TA 富集区^[11-14]。目前报道的 *mcr-1* 阳性类噬菌体质粒具有较高的核酸序列同源性, 其中大多数不具有自身转移性, 因此这类质粒对 *mcr-1* 的快速水平传播作用具有局限性^[4]。本研究中的 *mcr-1* 阳性类噬菌体质粒 pD72-*mcr-1* 具有不可接合性, 然而, 可接合性 F33:A-:B-型质粒与之融合后的共整合质粒具有可接合性, 这暗示 F33:A-:B-型质粒能够作为1个接合辅助质粒提供给不可接合质粒的接合转移能力, 进而促使 *mcr-1* 的快速传播^[4]。质粒融合使质粒进化成携带更多耐药基因的质粒, 然而该融合质粒在受体菌中是否能够稳定存在? 对受体菌是否产生适应性代价? 对该融合质粒的融合频率和接合频率也不清楚。鉴于此, 我们研究了该融合质粒的生物学特性, 评估了携带 *mcr-1* 多重耐药融合质粒在宿主菌中的适应性、融合和扩散能力, 旨在为多重耐药融合质粒介导 *mcr-1* 传播的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株信息

大肠杆菌 D72 菌株分离自猪肛门拭子样品; 接合实验得到携带融合质粒 pD72C (*bla*_{CTX-M-55} 阳性 F33:A-:B-型质粒 pD72-F33 与 *mcr-1* 阳性类噬菌体质粒 pD72-*mcr-1* 的共整合质粒) 的接合子 D72C、携带 pD72-F33 质粒的接合子 D72C-2。标准菌 *E. coli* 25922 及工程菌 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* C600、*E. coli* J53 为本实验室保存。采用微量肉汤稀释法测定原菌、受体菌及接合子的最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)。

1.2 质粒转化实验

用小提质粒试剂盒分别提取两个接合子的质粒, 通过电转化分别将质粒转入受体菌 *E. coli* DH5a 中, 获得携带 pD72C 的转化子 D1 和携带 pD72-F33 的转化子 D2。

1.3 生长曲线测定

将接合子 D72C、D72C-2 和 *E. coli* C600 划线培养后, 分别挑取单菌落到 2 mL 空白 LB 肉汤中, 于 37 °C 下以 200 r/min 的转速过夜培养。分别测

定接合子 D72C、D72C-2 的母液的 OD 值, 取 OD 值最接近的母液进行下一步实验。从母液中吸取 200 μ L 接种到含 20 mL 新鲜 LB 肉汤的锥形瓶中, 在 37 °C 下以 200 r/min 震荡培养。每隔 1 h 准确吸取 200 μ L 到 96 孔板中, 平行吸取 3 次, 以空白的 LB 肉汤作为空白对照, 测定在 600 nm 处的吸光值 OD₆₀₀。

1.4 质粒稳定性实验

将接合子 D72C 和 D72C-2 分别划线于 LB 琼脂培养基上, 在 37 °C 下过夜培养。挑取单菌落, 将其接种至 50 mL 无抗 LB 肉汤中, 过夜传代培养, 每株菌 3 个平行。吸取 50 μ L 培养液, 重复接种至新的 50 mL 无抗 LB 肉汤中, 连续传代 9 d。每隔 1 d 进行 1 次检测, 吸取 20 μ L 细菌培养液, 用灭菌生理盐水倍比稀释到合适浓度, 在无抗 LB 琼脂培养基上均匀地滴稀释液, 每个稀释梯度滴 3 个平行, 过夜培养。参照本课题组先前研究报告^[4]中的引物, 对在无抗 LB 琼脂平板上生长的所有菌落进行 PCR 鉴定。

1.5 体外竞争性实验

为了评估融合质粒 pD72C 和亲本质粒 pD72-F33 对宿主适应性的影响, 采用转化子 D1、D2 与 *E. coli* DH5a 进行体外竞争实验。挑取 D1 和 *E. coli* DH5a, 分别接种于 2 mL 无抗 LB 肉汤中, 于 37 °C、200 r/min 摇床上培养 12~16 h。取 OD₆₀₀ 值最相近的初始培养物母液, 以 1:1 的比例均匀混合。分别取 100 μ L 混合液接种到 100 mL 空白 LB 肉汤中 (1:1000), 同时设 4 个平行, 设此时为竞争性实验 0 h。于 37 °C、200 r/min 条件下震荡培养 24 h 后, 取混合液 100 μ L 接种到 100 mL 新鲜空白 LB 肉汤中 (1:1000)。此操作每 24 h 重复 1 次, 连续 4 d。在培养的 0、24、48、96 h 时, 对混合培养物各取 50 μ L 培养液, 利用灭菌生理盐水将其倍比稀释到合适的浓度, 然后涂布于无抗 LB 琼脂板, 在 37 °C 下培养 14~18 h。将从 LB 琼脂板上获得的单菌落全部转接到 2 μ g/mL 粘菌素 LB 琼脂板上, 于 37 °C 恒温下培养 14~18 h。参照文献 [4] 报道的引物, 进行菌落 PCR 鉴定。转化子 D2 的体外竞争实验也进行相同的操作。最后, 参照文献 [15] 的报道, 根据以下公式计算相对适应度 RF: $RF = (\lg S_{1,d_1} - \lg S_{1,d_0}) / (\lg S_{2,d_1} - \lg S_{2,d_0})$, 式中 S_{1,d_1} 和 S_{1,d_0} 分别是转化子在 24、48、72、96 和 0 h 时的菌落数; S_{2,d_1} 和 S_{2,d_0} 分别是 DH5a 在 24、48、72、96 和 0 h 时

的菌落数。当 $RF > 1$ 时,表明转化子相对于宿主菌有竞争优势;当 $RF = 1$ 时,表明质粒对宿主菌不产生适应性代价;当 $RF < 1$ 时,说明质粒对宿主菌造成了较大的适应性代价,转化子处于竞争劣势。体外竞争性实验重复 3 次,结果取 RF 的平均值。

1.6 质粒的融合频率和接合频率

以原菌 D72 为供体,以利福平抗性 *E. coli* C600 为受体,通过接合实验观察 pD72-mcr-1 和 pD72-F33:A-B-融合质粒的形成能力。分别在添加头孢噻肟(2 mg/L) 和利福平(450 mg/L) 的麦康凯琼脂板上,以及添加黏菌素(2 mg/L) 和利福平(450 mg/L) 的麦康凯琼脂板上筛选接合子。进一步以携带融合质粒 pD72C 和携带 pD72-F33 质粒的接合子 D72C 和 D72C-2 为供体,以叠氮钠抗性 *E. coli* J53 为受体进行接合实验,在含有黏菌素(2 mg/L) 和叠氮钠(100 mg/L)、头孢噻肟(2 mg/L) 和叠氮钠(100 mg/L) 的琼脂板上筛选 J53 接合子,以评价融合质粒和亲本质粒的水平转移能力。参照文献[4]报道的引物,对所有接合子进行 PCR 鉴定。融合频率的计算:融合频率=携带融合质粒 pD72C 的接合子数量/携带亲本质粒 pD72-F33 的接合子数量。接合频率计算:接合频率=接合子数量/(C600 数量+接合子数量)。

2 结果与分析

2.1 接合子及原菌的药敏性

从表 1 可以看出:原菌 D72 对多种药物耐药;携带融合质粒的接合子 D72C 对头孢噻肟和粘菌素的 MIC 值比受体菌分别升高了约 512 倍和 64 倍;bla_{CTX-M-55} 阳性质粒 pD72-F33 的接合子 D72C-2 对粘菌素敏感,而对头孢噻肟的 MIC 值比受体菌升高了约 512 倍。这些耐药表型与接合子携带的耐药基因一致。

2.2 细菌的生长曲线

以时间(h)为横坐标,以不同时间点的平均 OD₆₀₀ 值为纵坐标,绘制 D72C、D72C-2 和 *E. coli* C600 的生长曲线。最初 D72C、D72C-2 和 *E. coli* C600 母液的 OD₆₀₀ 值比较接近,分别为 0.035、0.033 和 0.031。图 1 显示,所有菌株均在 4 h 时达到对数期,在 10 h 时达到稳定期,且各时间节点的 OD₆₀₀ 值相近,3 株菌的生长曲线趋于一致,即接合子和受体菌的生长能力相似。

2.3 质粒的稳定性和竞争性

质粒的稳定性实验结果显示,在不含抗生素的环境中,融合质粒 pD72C 和亲本质粒 pD72-F33 连续传代 9 d 后仍能保持稳定存在,说明该质粒具有较高的稳定性,其携带的抗性基因可以稳定遗传。竞争性实验结果(图 2)显示,在培养过程中,携带融合质粒 pD72C 的转化子 D1 和携带亲本质粒 pD72-F33 的转化子 D2 数量都高于受体菌 *E. coli* DH5a 的数量,相对适应度 RF 均大于 1,说明融合质粒 pD72C 和亲本质粒 pD72-F33 对宿主菌均呈现出适应性优势。融合质粒 pD72C 的相对适应性高于 pD72-F33 的相对适应性,尤其是在 96 h 时,质粒 pD72-F33 的相对适应度性稍微降低,而融合质粒 pD72C 的突然增大,表现出比 pD72-F33 更明显的竞争优势。

表 1 大肠杆菌分离株 D72、接合子及受体菌的 MIC 值

抗菌药	D72	D72C	D72C-2	<i>E. coli</i> C600
氨苄西林	>128	>128	>128	2
头孢噻肟	>256	64	64	≤0.125
头孢他啶	32	8	8	≤0.125
粘菌素	8	8	≤0.125	≤0.125
氟苯尼考	128	2	2	2
阿米卡星	1	1	1	1
卡那霉素	>256	8	8	8
新霉素	128	8	8	8
恩诺沙星	8	0.008	0.008	0.008
环丙沙星	8	0.015	0.015	0.015
磷霉素	≤32	≤32	≤32	≤32

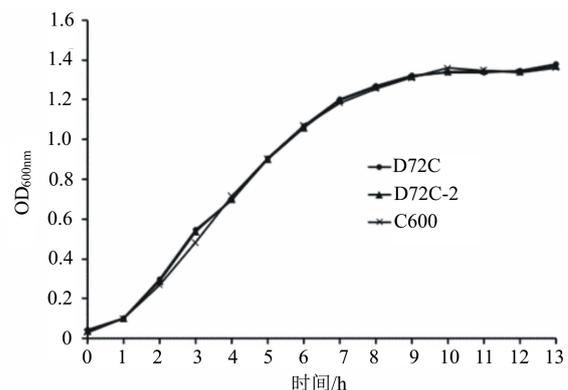


图 1 接合子与受体菌的生长曲线

2.4 质粒的融合频率和接合频率

实验结果表明:质粒的融合频率较高,为 6.43×10^{-3} ;融合质粒 pD72C 和亲本质粒 pD72-F33 的接合频率分别为 0.82×10^{-1} 和 3.19×10^{-1} 。

3 讨论

适应性是指耐药菌在没有药物选择压力的情况下生长、定殖等方面的能力。细菌在药物的选

择压力下,可以通过染色体基因突变和质粒上耐药基因的水平转移等获得耐药性以适应环境的变化,但是当药物选择压力去除后,耐药菌株中基因的突变、外源基因的表达以及质粒的导入等会对宿主菌造成负担,其适应性可能低于敏感菌,在菌群中逐渐成为劣势菌,这一现象称为适应性代价。一般说来,质粒和染色体抗性基因都会导致细菌适应性代价的产生^[16]。耐药菌的适应性研究主要包括耐药菌是否能快速适应宿主或环境?能否在与敏感菌的生长竞争中成为优势菌群?质粒的稳定性是指质粒经复制后分配到子代细菌中的能力。耐药质粒在宿主菌中稳定的传代可以保证耐药性的维持,同时有更多的机会传递到其他菌中,增加耐药基因传播的机会。

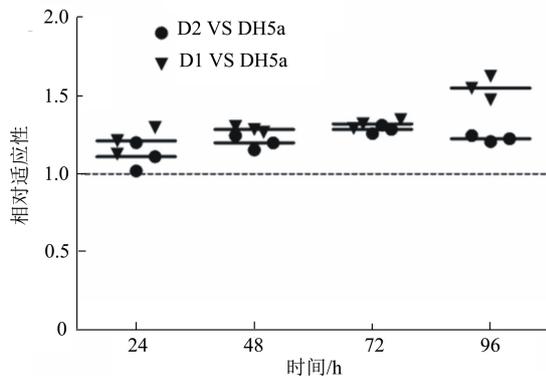


图2 转化子体外竞争的相对适应性

本文通过融合质粒的稳定性、生长竞争性实验,以及融合频率和接合频率来研究融合质粒的生物学特征,以评估在接合过程中形成的多重耐药融合质粒对宿主菌的适应性、融合和扩散能力。本研究通过测定生长曲线、质粒稳定性、体外竞争实验来分析 *mcr-1* 阳性类噬菌体质粒与 *bla*_{CTX-M-55} 阳性 F33:A-B-型质粒共整合形成的融合质粒对宿主的适应性代价。发现接合子 D72C、D72C-2 和 *E. coli* C600 的生长曲线基本一致,表明该融合质粒不影响宿主菌的生长能力。融合质粒和亲本质粒 pD72-F33 在无抗条件下能够稳定传代 9 d,这表明通过共整合形成的融合质粒比较稳定,有促进多重耐药菌株形成的可能。体外竞争实验结果表明融合质粒和亲本质粒不对宿主菌产生适应性代价。何良英等^[17]报道了犬源大肠杆菌 7A8 的 F33:A-B-型多重耐药质粒 pHN7A8 在宿主菌 JM109 中具有较高的稳定性和适应性。F33:A-B-型质粒上存在的一些沉溺系统可以提高质粒的

稳定性和适应性,这可能是 F33:A-B-型质粒在肠杆菌中流行的主要原因^[1]。本研究发现,携带融合质粒的转化子的相对适应性高于亲本质粒的相对适应性,尤其是在培养 96 h 时,融合质粒的相对适应性突然增大,这表明质粒融合后,并没有因为获得较大序列片段而增加宿主的负担,反而有利于宿主的生存,其具体的原因有待进一步研究。本研究结果显示,该融合质粒具有较高的融合频率和接合频率,说明可接合性 F33:A-B-质粒能够以较高的频率捕获不可接合性 *mcr-1* 阳性类噬菌体质粒,进而促进 *mcr-1* 的水平传播,并且在捕获类噬菌体质粒这个较大的片段后,F33:A-B-质粒自身的转移性和适应性不受到影响。本研究中携带 *mcr-1* 的类噬菌体质粒本身不具有可接合性,而该质粒通过与可接合的 *bla*_{CTX-M-55} 阳性 F33:A-B-型质粒 pD72-F33 融合,不仅使自身具有了可接合性,而且不对宿主菌产生适应性代价,同时有着较高的融合频率和接合频率。该融合质粒所具有的良好生物学特性可能会促使 *mcr-1* 的快速传播及多重耐药质粒的进化,这将导致多重耐药菌的产生,从而给临床感染治疗带来挑战。以后应进一步研究影响质粒融合的因素,为采取相应措施避免多重耐药融合质粒的形成及传播提供理论依据。

4 结论

mcr-1 阳性类噬菌体质粒和 F33:A-B-质粒共整合形成的融合质粒在宿主菌中能够稳定传代,对宿主菌有较好的适应性优势,拥有较强的扩散能力。

参考文献:

- [1] Yang X, Liu W, Liu Y, et al. F33:A-B-, IncHI2/ST3, and IncII/ST71 plasmids drive the dissemination of *fosA3* and *bla*_{CTX-M-55/-14/-65} in *Escherichia coli* from chickens in China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014(5): 688.
- [2] Hou J, Huang X, Deng Y, et al. Dissemination of the fosfomycin resistance gene *fosA3* with CTX-M β -lactamase genes and *rmtB* carried on IncFII plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(4): 2135-2138.
- [3] Wang J, Zeng Z, Huang X, et al. Evolution and comparative genomics of F33:A-B- plasmids carrying *bla*_{CTX-M-55} or *bla*_{CTX-M-65} in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from animals, food products, and humans in China [J].

- MSphere , 2018 , 3(4) : 137-138.
- [4] He D , Zhu Y , Li R , et al. Emergence of a hybrid plasmid derived from IncN1-F33:A-B- and *mcr-1*-bearing plasmids mediated by IS26 [J]. 2019 , 74: 3184-3189.
- [5] Liu Y , Wang Y , Walsh T R , et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study [J]. Lancet Infectious Diseases , 2016 , 16(2) : 161-168.
- [6] Walkty A , Karlowsky J A , Adam H J , et al. Frequency of MCR-1-mediated colistin resistance among *Escherichia coli* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals (CANWARD 2008~2015) [J]. CMAJ Open , 2016 , 4(4) : E641-E645.
- [7] Leangapichart T , Gautret P , Brouqui P , et al. Acquisition of *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during Hajj 2013 and 2014 [J]. Antimicrob Agents Chemother , 2016 , 60(11) : 6998-6999.
- [8] Li X S , Liu B G , Dong P , et al. The prevalence of *mcr-1* and resistance characteristics of *Escherichia coli* isolates from diseased and healthy pigs [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease , 2018 , 91(1) : 63-65.
- [9] Li R , Xie M , Zhang J , et al. Genetic characterization of *mcr-1*-bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy , 2017 , 72(2) : 393-401.
- [10] Wu R , Yi L , Yu L , et al. Fitness advantage of *mcr-1*-bearing IncI2 and IncX4 plasmids in vitro [J]. Frontiers in Microbiology , 2018(9) : 331.
- [11] Li R , Yu H , Xi M , et al. Genetic basis of chromosomally-encoded *mcr-1* gene [J]. International Journal of Antimicrobial Agents , 2018 , 51(4) : 578-585.
- [12] Snesrud E , Ong A C , Corey B , et al. Analysis of serial isolates of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* reveals a highly active IS*Apl1* transposon [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy , 2017 , 61(5) : 56-57.
- [13] Snesrud E , He S , Chandler M , et al. A model for transposition of the colistin resistance gene *mcr-1* by IS*Apl1* [J]. Antimicrobial Agents Chemother , 2016 , 60(11) : 6973-6976.
- [14] Poirel L , Kieffer N , Nordmann P. In vitro study of IS*Apl1*-mediated mobilization of the colistin resistance gene *mcr-1* [J]. Antimicrobial Agents Chemother , 2017 , 61(7) : e00127-17.
- [15] Wang J , Guo Z , Zhi C , et al. Impact of plasmid-borne *oqx-AB* on the development of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli* [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy , 2017 , 72(5) : 1293-1302.
- [16] Bjorkman J , Nagaev I , Berg O , et al. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance [J]. Science , 2000 , 287(5457) : 1479-1482.
- [17] 何良英 , 刘兰平 , 曾振灵 等. 携带 *bla*_{CTX-M-65} , *rmtB* 和 *fosA3* 多重耐药质粒 pHN7A8 的适应性研究 [J]. 畜牧兽医学报 , 2016 , 47(1) : 172-176.

(责任编辑: 黄荣华)