



耐喹诺酮类抗生素的鱼源嗜水气单胞菌中内生质粒 pAhW39 的克隆及功能

康兴宇¹, 王超杰¹, 王至诚¹, 王卫民¹, 罗毅^{1,2*}

(1. 华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070;

2. 华中农业大学, 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为探究嗜水气单胞菌中内生质粒与菌株对喹诺酮类抗生素耐药表型的关系, 实验克隆并分析了分离自湖北仙桃某渔场患病团头鲂的对喹诺酮类抗生素耐药的嗜水气单胞菌 W39 菌株中的质粒 pAhW39。测序结果显示, 质粒 pAhW39 的大小为 6 739 bp, GC 含量为 46.13%, 低于目前已公布的嗜水气单胞菌染色体 DNA 的 GC 含量 (60.1%~62.0%), 表明该质粒可能是通过水平转移而获得; 含有 4 个预测的开放阅读框 (ORF), 即 *nspV*、*nspV-like*、*repB* 和 *qnrS2*, 分别负责编码 II 型核酸内切酶 NspV 和 NspV-like、复制蛋白 RepB 和喹诺酮类耐药蛋白 QnrS2。在无抗生素压力条件下, 质粒 pAhW39 的稳定性较高, 不容易丢失。通过微量肉汤稀释法检测菌株耐药性发现, 与质粒 pAhW39 消失株 (W39-C) 相比, 喹诺酮类的萘啶酸和环丙沙星对 W39 菌株的最小抑菌浓度分别升高 16 倍和 8 倍, 表明载有 *qnrS2* 的 pAhW39 介导了 W39 菌株对喹诺酮类药物的耐药表型。比较基因组分析发现, pAhW39 与分离自美国马里兰州某医院管道废水的气单胞菌 ASNIH2 菌株中的质粒 pAER-e58e 相似度极高, 碱基一致性高达 99.9%, 表明 pAhW39 (或 pAER-e58e) 传播具有广泛性和稳定性, 同时提醒我们质粒介导的喹诺酮类抗生素耐药在鱼源气单胞菌中的存在, 可能会导致喹诺酮类抗生素耐药表型在水产养殖上快速而广泛地传播。

关键词: 嗜水气单胞菌; 内生质粒; 序列克隆; 耐药; 喹诺酮类

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 广泛存在于水体中, 是水产养殖中重要的条件致病菌^[1], 可导致水产动物出现败血症, 对水产养殖业危害较大, 并造成巨大经济损失^[2]。同时也可以导致人类发生严重感染^[3]。

对于细菌性疾病的防治, 有效且常用的方法是使用抗菌类药物, 比如喹诺酮类、磺胺类、氨基糖苷类及四环素类等^[4]。然而, 随着水产养

殖高密度、集约化的发展, 细菌病害频发, 抗菌药物的不合理使用, 从而导致耐药、甚至是多重耐药细菌的产生, 给水产养殖和人类健康造成了重大威胁^[5]。

喹诺酮类抗菌药物是国家批准使用的主要渔用抗菌药物之一^[6]。细菌对喹诺酮类药物的耐药机制主要包括喹诺酮类耐药决定区靶基因 (如 DNA 促旋酶基因、拓扑异构酶 IV 基因等) 的突

收稿日期: 2020-04-05 修回日期: 2020-10-10

资助项目: 国家自然科学基金 (31570078)

第一作者: 康兴宇 (照片), 从事水产动物疾病与防控研究, E-mail: 1061698732@qq.com

通信作者: 罗毅, luoyi@mail.hzau.edu.cn



变、细菌质粒介导的喹诺酮类耐药、细胞膜通透性改变以及细菌的主动外排系统改变等^[7]。其中, 质粒介导的喹诺酮类耐药其传播方式主要为水平传播, 可以利用质粒的可移动性在细菌间广泛传播^[8]。目前, 有关气单胞菌喹诺酮类耐药质粒分子特征的研究尚处于起步阶段^[9]。

本实验室前期从患病团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 中分离获得了一株对喹诺酮类抗生素耐药的嗜水气单胞菌 W39。本研究目的在于检测 W39 的内生质粒, 并对质粒进行序列测定及分析, 探究质粒与菌株喹诺酮耐药的的关系, 以期深入了解气单胞菌喹诺酮类抗生素的耐

药机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及培养条件

本实验所用菌株和质粒信息见表 1。用 Luria-Bertani (LB) 液体培养基或者 LB 固体培养基于 28 °C 下培养嗜水气单胞菌或大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 氨苄西林 (Ampicillin, Amp) 的使用浓度为 100 μg/mL。通过分光光度计测定其在 600 nm 处的吸光值 (OD₆₀₀) 来检测细菌的生长。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Tab. 1 The bacterial strains and plasmids used in this study

菌株和质粒		特征	来源
strains and plasmids		characteristics	source
菌株	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> W39	野生型菌株, 分离于湖北仙桃某渔场患病团头鲂, 对喹诺酮类抗生素耐药, 含内生质粒 pAhW39	本实验
	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> W39-C	<i>A. hydrophila</i> W39 的 pAhW39 质粒丢失株	本实验
	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> X2	野生型菌株, 分离于湖北仙桃某渔场患病团头鲂, 不含可检测到的内生质粒	本实验
	大肠杆菌 <i>E. coli</i> DH5α	克隆宿主菌株	Invitrogen
质粒	pAhW39	<i>A. hydrophila</i> W39 的内生质粒, 6 739 bp	本实验
	pDG780	克隆载体, 4 445 bp, Amp, 在其多克隆位点上存在一个 <i>Xba</i> I 位点	BGSC ^[10]

1.2 抗生素最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 检测

根据美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 标准^[11-13], 以及参考已有文献^[9], 我们测定了萘啶酸 (Nalidixic acid, NA) 及环丙沙星 (Ciprofloxacin, CIP) 的最小抑菌浓度。用 LB 液体培养基将嗜水气单胞菌 W39 和 pAhW39 缺失株 (W39-C) 菌液浓度调整至 1×10^6 CFU/mL, 将萘啶酸及环丙沙星用 LB 液体培养基稀释至特定浓度。每个样品 200 μL 中含有 100 μL 梯度稀释的抗生素和 100 μL 调整至固定浓度的菌液, 置于平底 96 孔板中, 28 °C 下培养 24 h 后记录菌株生长情况。抑制细菌生长的最低药物浓度即为其最小抑菌浓度。萘啶酸及环丙沙星购买自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 质粒的提取、克隆及测序

采用常规碱抽提法提取质粒 DNA^[14]。通过琼脂糖凝胶电泳 (0.8%, *W/V*) 分离质粒 DNA, 切

除 pAhW39 对应的条带, 用 E.N.Z.A. 凝胶提取试剂盒 (Omega, 中国上海) 洗脱纯化质粒 DNA。用多种限制性内切酶消化 pAhW39, 琼脂糖凝胶电泳 (0.8%, *W/V*) 检测酶切产物, 构建质粒 pAhW39 的限制性内切酶图谱。

将 *Xba* I 酶解的 pAhW39 与同样经 *Xba* I 酶解的克隆载体 pDG780 用 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa, 日本) 进行连接, 连接产物通过电转化导入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。重组菌株通过含有 Amp 的 LB 平皿中筛选获得, 从而获得重组质粒 (pAhW39-*Xba* I-pDG780)。

DNA 测序由武汉擎科创新生物科技有限公司进行。利用克隆载体 pDG780 上的通用引物 (M13F/M13R) 对重组质粒 (pAhW39-*Xba* I-pDG780) 中的 pAhW39-*Xba* I 片段进行测序, 获得质粒 pAhW39 的初始序列。根据 pAhW39 序列设计特异性引物, 对 pAhW39 内部区域进行测序, 最终获得 pAhW39 的全序列。

1.4 序列分析

使用 BLAST (<https://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>) 和 GenBank 数据库分析 DNA 序列和氨基酸序列。使用 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测开放阅读框 (ORF)。

1.5 质粒稳定性分析

嗜水气单胞菌 W39 在 LB 液体培养基中 28 °C 过夜培养, 将培养物按 1% (V/V) 接种到新鲜 LB 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 24 h, 重复接种 10 d。每天的培养物用 LB 稀释后, 涂布于 LB 固体培养基上, 28 °C 培养 24 h 以获取单菌落。对于每个样品, 随机挑选 100 个单菌落分别对应转接到不含抗生素萘啶酸 (NA⁻) 和含有 NA (NA⁺) (16 μg/mL) 的 LB 固体培养基上。质粒的稳定性通过在 NA⁺ LB 固体培养基上生长出的单菌落个数来确定。每个实验重复 3 次。

在检测质粒稳定性时, 对在 NA⁻ LB 固体培养基上生长、但 NA⁺ LB 固体培养基上不生长的克隆子进行质粒碱抽提检测, 证实质粒 pAhW39 的丢失, 将该克隆子命名为 W39-C。

1.6 质粒的转化

质粒的电转化及感受态细胞的制备, 参考《分子克隆实验指南 (第四版)》^[14] 进行。

2 结果

2.1 喹诺酮类抗生素对 W39 菌株的 MIC

检测了喹诺酮类抗生素——NA 及环丙沙星 (Ciprofloxacin, CIP) 对 W39 菌株的最小抑菌浓度。结果发现, NA 对 W39 菌株的 MIC 为 16 μg/mL, CIP 对 W39 菌株的 MIC 为 4 μg/mL (表 2)。W39 菌株对 NA 和 CIP 都表现出一定的耐药, 对 NA 的耐药程度更高。

表 2 萘啶酸 (NA) 和环丙沙星 (CIP) 对菌株 W39 和 W39-C 的最小抑菌浓度

Tab. 2 The minimum inhibitory concentrations of NA and CIP against strains W39 and W39-C

菌株 strain	抗生素 antibiotic	药物浓度 (μg/mL) concentration											
		0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	
W39	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
W39-C	NA	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
W39	CIP	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
W39-C	CIP	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	

注: +, 生长; -, 不生长

Notes: +, growth; -, no growth

2.2 W39 菌株中的内生质粒

利用碱抽提法对 W39 菌株进行内生质粒抽提检测, 琼脂糖凝胶电泳成像结果显示仅有一个条带 (图 1), 说明 W39 菌株中仅有一个小于 23 kb 的质粒。我们将该质粒命名为 pAhW39。

2.3 质粒 pAhW39 的克隆及功能分析

为得到 pAhW39 质粒的 DNA 序列, 实验首先利用单个限制性内切酶 (*Bgl* II、*Xba* I、*Bam*H I 和 *Cla* I) 分别对质粒 DNA 进行酶切, 以获取合适的酶切位点对 pAhW39 进行克隆。结果显示, pAhW39 经 *Xba* I 和 *Cla* I 分别酶切后, 两种酶切产物大小一致, 且均约为 6.5 kb 的酶切片段, 表明 pAhW39 中分别存在一个 *Xba* I 和 *Cla* I 的酶切位点; pAhW39 经 *Bgl* II 和 *Bam*H I 分别酶切后, 产物分别有 2 个大小不等的酶切片段, 且 2 个片

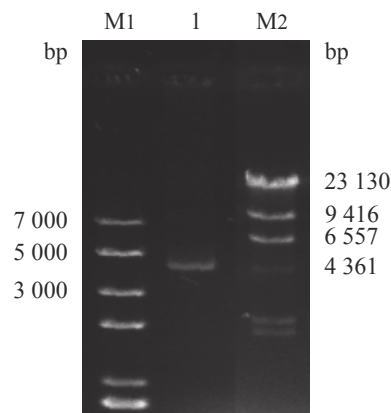


图 1 W39 菌株的内生质粒的检测

M1. DL7 000 分子量标准; 1. 样品质粒 pAhW39; M2. λ DNA/ *Hind* III 单切 DNA 分子量标准

Fig. 1 Plasmid pattern of strain W39

M1. DL7 000 Markers; 1. plasmid of sample pAhW39; M2. direct-load™ λ DNA/ *Hind* III

段大小之和均约 6.5 kb, 表明 pAhW39 质粒中分别存在 2 个 *Bgl* II 和 *Bam*HI 的酶切位点 (图 2)。

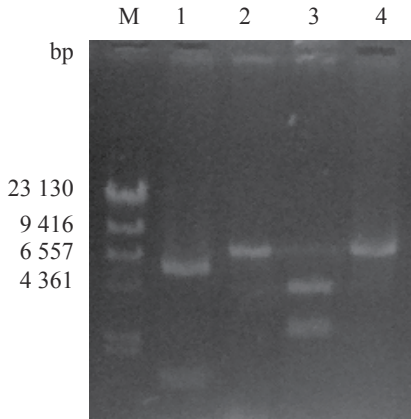


图 2 pAhW39 质粒酶切图谱

M. λ DNA/*Hind* III 单切 DNA 分子量标准; 1-4. 分别用 *Bgl* II、*Xba* I、*Bam*HI 和 *Cla* I 消化 pAhW39 的酶切图谱

Fig. 2 Restriction patterns of pAhW39

M. direct-load™ λ DNA/*Hind* III; 1-4. restriction patterns of pAhW39 by digestion with *Bgl* II, *Xba* I, *Bam*HI and *Cla* I, respectively

实验选择仅有单个酶切位点的 *Xba* I 对质粒 pAhW39 进行酶切, 产生的线状 DNA 片段与同样经 *Xba* I 消化的已知载体 pDG780 进行连接, 从而将 pAhW39 质粒成功克隆到载体 pDG780 (图 3)。利用载体 pDG780 中 *Xba* I 位点 2 侧的通用引物 (M13F/M13R) 位点及引物步移法 (primer walking method), 最终得到了 pAhW39 完整的 DNA 序列。pAhW39 序列已提交 GenBank 数据库, 登录号为 MT218433。

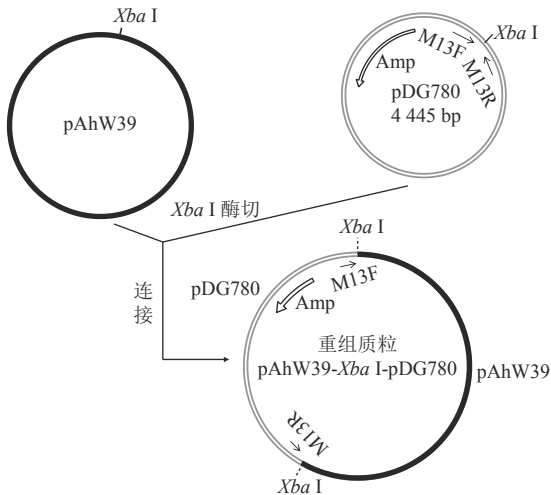


图 3 质粒 pAhW39 的克隆流程示意图

Fig. 3 Diagram of the recombinant plasmid pAhW39-*Xba*I-pDG780 constructed for pAhW39 sequencing

pAhW39 测序结果显示, 其大小为 6 739 bp, GC 含量为 46.13%, 低于目前已知的其他嗜水气单胞菌中质粒的 GC 含量 (50.0%~60.3%), 也明显低于目前已公布的嗜水气单胞菌染色体 DNA 的 GC 含量 (60.1%~62.0%) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1422>), 表明该质粒可能是其他种属细菌的质粒通过水平转移而来。

pAhW39 中共预测有 4 个 ORF, 分别是 *nspV* (174~836 nt)、*nspV-like* (833~2 245 nt)、*repB* (4 283~4 513 nt) 和 *qnrS2* (5 697~5 041 nt) (图 4)。*nspV* 和 *nspV-like* 分别编码包含 220 和 470 个氨基酸的蛋白质 NspV 和 NspV-like, 其中, NspV 与来自于气单胞菌 ASNIH2 菌株中 pAER-e58e 质粒上 *nspV* 编码的 II 型核酸内切酶 NspV (GenBank 登录号: AUY12370) 的氨基酸一致性为 99%, NspV-like 与同样来源 II 型核酸内切酶 NspV-like (GenBank 登录号: AUY12367) 的氨基酸一致性为 100%。pAhW39 中的 *repB* 编码一个包含 76 个氨基酸的蛋白质, 其与气单胞菌 A35_P 菌株中的质粒复制蛋白 RepB (GenBank 登录号: OZG42788) 的氨基酸一致性为 73.7%, 与质粒复制蛋白 RepB (GenBank 登录号: AUY12341) 的氨基酸一致性为 61.8%。pAhW39 中存在一个 *qnrS2*, 编码一个包含 218 个氨基酸的蛋白质, 该蛋白质与来自于嗜水气单胞菌中的喹诺酮类耐药蛋白 QnrS2 (GenBank 登录号: YP_006961374)、质粒蛋白 QnrS2 (GenBank 登录号: AUY12368) 的氨基酸一致性均为 100%。

pAhW39 中的 4 个 ORF 与分离自美国马里

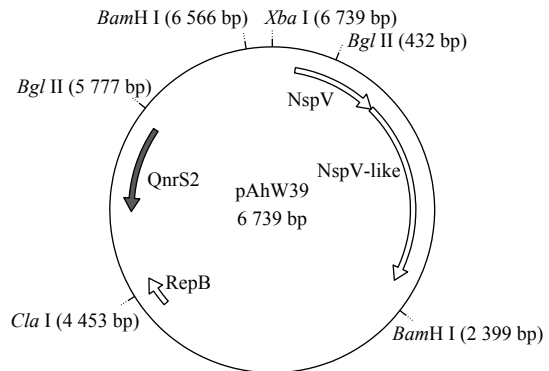


图 4 质粒 pAhW39 物理图谱

酶切位点如图标注, 括号里为碱基位置; 箭头指示 4 个 ORFs 的方向和长度

Fig. 4 Physical and genetic map of plasmid pAhW39

The restriction sites used in this study and their base positions in brackets are shown; arrows indicate the directions and lengths of the four ORFs

兰州某医院管道废水的气单胞菌 ASNIH2 中 pAER-e58e 质粒的 ORF 排列组成相似。pAER-e58e 大小为 6 782 bp (GenBank 登录号: CP026410), 2 个质粒的碱基序列一致性为 99.9%, 表明 pAhW39 与 pAER-e58e 的相似度极高。pAhW39 与达卡气单胞菌 (*A. dhakensis*) F2S2-1 中的 pAH-F2S2-1 质粒 (5 099 bp; GenBank 登录号: KX863709) 也具有一定相似度, 二者间的碱基一致性为 64.7%。对 3 个质粒进行了基因组共线性分析, 结果显示, 其共线性关系较好, 特别是 pAhW39 与 pAER-e58e 相似度高, 匹配度好, 2 个质粒均含有一个喹诺酮类耐药基因 *qnrS2*; pAH-F2S2-1 不含 *qnrS2*, 但同样含有 II 型核酸内切酶基因 *nspV* 和 *nspV-like* (图 5)。除此外, pAhW39 与 NCBI 数据库中其他已知质粒并无明显相似度。

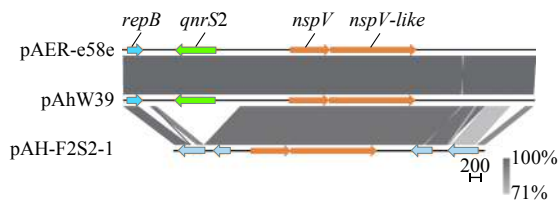


图 5 pAhW39、pAER-e58e 和 pAH-F2S2-1 共线性分析结果

箭头所示为 ORF; pAH-F2S2-1 中含有 4 个假定蛋白基因

Fig. 5 Collinear analysis result of plasmid pAhW39, pAER-e58e and pAH-F2S2-1

The ORF is represented by the arrow; pAH-F2S2-1 contains four putative protein genes

2.4 pAhW39 质粒的稳定性

在无抗生素压力条件下, 实验检测了 pAhW39 的稳定性。W39 菌株在 28 °C 培养条件下, pAhW39 前 3 天稳定性为 100%, 继续培养 5~10 d 后, 个别发生丢失, 稳定性为 (98%~99%)±1%。对 W39 菌株中 pAhW39 质粒丢失后的菌株进行了质粒碱抽提检测, 确实未发现 pAhW39 的条带, 证实了 pAhW39 已丢失。结果表明, 在 28 °C 条件下, pAhW39 的稳定性较高, 不容易丢失。

2.5 质粒 pAhW39 的耐药表型

为验证 pAhW39 的耐药表型, 我们检测了 NA 和 CIP 对 W39-C 菌株的 MIC。结果发现, NA 对 W39-C 菌株的 MIC 下降为 1 μg/mL, CIP 对 W39-C 菌株的 MIC 则下降为 0.5 μg/mL (表 2), 表明 pAhW39 确实提高了 W39 菌株对喹诺酮类

抗生素 (NA 和 CIP) 的耐药性。

为进一步验证 pAhW39 是否介导了喹诺酮类药物的耐药表型, 我们将 pAhW39 转化至不含质粒、且对 NA 和 CIP 敏感的嗜水气单胞菌 X2 中 (NA 对 X2 菌株的 MIC 为 1 μg/mL, CIP 对 X2 的 MIC 为 0.5 μg/mL)。结果发现, NA 和 CIP 对含有 pAhW39 的 X2 菌株的 MIC 明显升高 (NA 对含有 pAhW39 的 X2 菌株的 MIC 为 16 μg/mL, CIP 对含有 pAhW39 的 X2 菌株的 MIC 为 8 μg/mL), 含有 pAhW39 的 X2 菌株表现出了明显的对喹诺酮类抗生素 (NA 和 CIP) 的耐药表型。

3 讨论

目前为止, 只有少量气单胞菌的质粒 DNA 序列被报道和公布, 例如 pAhX22^[15]、pAhy2.5^[16]、pAHH04^[17]、pBRST7.6^[18]、pAQ2-1/pAQ2-2^[19]、pAsa1/pAsa3^[20]、pAER-e58e^[21] 和 pAH-F2S2-1^[22] 等。因此, pAhW39 质粒序列的获得会丰富气单胞菌的质粒序列数据库, 便于我们研究这种可移动的气单胞菌遗传因子。

据报道, 气单胞菌中的质粒上常常带有编码耐药性或毒力的相关基因^[23-24]。质粒被认为是介导环境中同一种细菌或不同细菌之间发生遗传物质水平传播或垂直传播的主要因素^[16, 25]。质粒介导的喹诺酮类耐药基因主要有 *qnrA*、*qnrB*、*qnrS* 和 *aac(6')-Ib-cr* 等^[26]。迄今为止, 有关质粒介导的喹诺酮类耐药基因先后在多个国家和地区、不同来源 (人、环境、动物和食品等)、不同种属细菌中被发现, 而有关气单胞菌喹诺酮类耐药质粒分子特征的研究则尚处于起步阶段^[9, 27-29]。本研究中, pAhW39 质粒上存在一个喹诺酮类耐药基因 *qnrS2*, 其所编码的 Qnr 类蛋白能够保护细菌 DNA 促旋酶、拓扑异构酶 IV 等靶位酶, 阻止其与喹诺酮类药物结合而产生耐药^[8]。本研究结果发现, 含有 pAhW39 质粒的 W39 菌株, 相较于不含 pAhW39 质粒的 W39-C 菌株, 对 NA 的 MIC 升高 16 倍, 对 CIP 的 MIC 升高 8 倍 (表 2); 通过转化导入方式而含有 pAhW39 的 X2 菌株, 相较于不含 pAhW39 的野生型菌株 X2, 其对 NA 和 CIP 的 MIC 均升高 16 倍, 这些结果证实了载有 *qnrS2* 的 pAhW39 质粒介导了 W39 菌株对喹诺酮类药物的耐药性。本课题组前期研究中, 利用该质粒上的 *qnrS2* 作为抗性筛选标记改造了一个荧光蛋白表达质粒载体, 并成功通过 NA 筛

选得到正确的克隆子, 且数据表明 pAhW39 的耐药性确实是由 *qnrS2* 所介导。

此外, pAhW39 上还存在限制性内切酶基因 *nspV* 和 *nspV-like*, 能编码 II 型限制性内切酶 NspV 和 NspV 酶同源物, 被认为能清除外源 DNA, 维持自身遗传物质稳定性^[30-31]。因此, 推测 pAhW39 上存在的 *nspV* 和 *nspV-like* 对维持细菌自身遗传物质 (包括 pAhW39) 稳定起作用。

有研究报道, 在气单胞菌中存在能够自主发生接合转移的质粒, 如 pRAS1^[32] 和 pSN254^[33] 等。自主转移质粒往往携带与质粒转移有关的元件, 包括 *oriT* 转移起始位点、松弛酶 (relaxase) 基因、IV 型分泌系统 (T4SS) 基因和 IV 偶联蛋白 (T4CP) 基因^[34] 等。有些质粒缺少部分结合转移相关元件, 如苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) YBT-1518 内生质粒 pBMB0228, 其在自主结合质粒 pAW63 存在的情况下, 可以发生被动的结合转移^[35]。为探讨 pAhW39 是否可以发生自主结合转移, 我们进行了 pAhW39 的结合转移实验, 但最终未能获得阳性转化子。由于 pAhW39 中并不包含松弛酶、T4SS 和 T4CP 等质粒自主结合转移所需的基因元件, 因此推测 pAhW39 不能发生自主结合转移。有关自主结合质粒 (如 pAW63 等) 是否能介导 pAhW39 发生转移有待进一步研究。

比较基因组分析时发现, pAhW39 与 pAER-e58e 的相似度极高, 除了质粒大小相近, 碱基一致性高达 99.9%。值得注意的是, pAER-e58e 来自于菌株 ASNIH2, 而该菌株分离自美国马里兰州某医院的管道废水^[21]。2 株来源完全不同的气单胞菌 (W39 和 ASNIH2) 却拥有相似度极高的内生质粒, 一方面提示 pAhW39 或 pAER-e58e 传播的广泛性和稳定性, 另一方面也提示气单胞菌对人类和鱼类具有共感染的风险和威胁。pAH-F2S2-1 来自于 F2S2-1 菌株, 该菌株分离自印度油沙丁鱼 (*Sardinella longiceps*) 的表层皮肤^[22], pAhW39 与 pAH-F2S2-1 的碱基一致性为 64.7%。

喹诺酮类抗生素作为首选药物在水产养殖中应用广泛, 但由于长期不合理使用, 使水产致病菌长期暴露于药物的选择压力下, 不可避免地产生耐药甚至是多重耐药, 这给水产动物细菌性疾病的防治带来困难; 同时随着抗生素药物用量的增加, 抗生素药物在水产动物体内

残留的风险增高, 给人类的食品安全带来威胁^[36-39]。本实验中 pAhW39 质粒介导的喹诺酮类抗生素耐药在水产动物源气单胞菌中存在, 预示喹诺酮类抗生素耐药很可能会在水产养殖上快速、广泛传播, 应引起水产养殖者的重视。

参考文献 (References):

- [1] 张美超, 曹雅男, 姚斌, 等. 淬灭酶 AiiO-AIO6 酶学性质及对嗜水气单胞菌毒力因子的表达调控[J]. 水产学报, 2011, 35(11): 1720-1728.
Zhang M C, Cao Y N, Yao B, et al. Characteristics of quenching enzyme AiiO-AIO6 and its effect on *Aeromonas hydrophila* virulence factors expression[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(11): 1720-1728(in Chinese).
- [2] 朱大玲, 李爱华, 汪建国, 等. 嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2006, 45(1): 82-85.
Zhu D L, Li A H, Wang J G, et al. The correlation between the distribution pattern of virulence genes and the virulence of *Aeromonas hydrophila* strains[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2006, 45(1): 82-85(in Chinese).
- [3] Ghatak S, Blom J, Das S, et al. Pan-genome analysis of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* and *Aeromonas caviae* indicates phylogenomic diversity and greater pathogenic potential for *Aeromonas hydrophila*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2016, 109(7): 945-956.
- [4] 李爱华. 水产养殖中使用的抗菌药物及细菌耐药性[J]. 中国水产科学, 2002(1): 87-91.
Li A H. Antibacterial drugs used in aquaculture and drug resistance of fish bacterial pathogens[J]. Journal of Fish Sciences of China, 2002(1): 87-91(in Chinese).
- [5] 蔡丽娟, 许宝青, 林启存. 水产致病性嗜水气单胞菌耐药性比较与分析[J]. 水产科学, 2011, 30(1): 42-45.
Cai L J, Xu B Q, Lin Q C. Comparison and analysis of drug resistance to moribund bacterium *Aeromonas hydrophila* isolated from aquatic animals[J]. Fisheries Science, 2011, 30(1): 42-45(in Chinese).
- [6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
Commission of Chinese veterinary pharmacopoeia. Veterinary pharmacopoeia of the people's republic of

- China[M]. Beijing: China Agriculture Press Co, 2015 (in Chinese).
- [7] Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, *et al.* Mechanism of action of and resistance to quinolones[J]. *Microbial Biotechnology*, 2009, 2(1): 40-61.
- [8] 闫雷, 徐海. 质粒介导的喹诺酮耐药基因*qnr*的分类、耐药机制及其在国内的流行状况[J]. *微生物学报*, 2016, 56(2): 169-179.
- Yan L, Xu H. Classification and prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in China—a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(2): 169-179(in Chinese).
- [9] 谭爱萍. 水产动物源气单胞菌耐药性与质粒介导喹诺酮类耐药研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- Tan A P. Surveillance of antimicrobial resistance and study of plasmid-mediated quinolone resistance among *Aeromonas* isolates from difference aquatic animals[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [10] Guérout-Fleury A M, Shazand K, Frandsen N, *et al.* Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*[J]. *Gene*, 1995, 167(1-2): 335-336.
- [11] Clinical and laboratory standards institute. M100-S22 performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement[S]. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012: 68-69.
- [12] Clinical and laboratory standards institute. M45A-A2 methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria[S]. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010: 12-13.
- [13] Magiorakos A P, Srinivasan A, Carey R B, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 18(3): 268-281.
- [14] Green M R, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual (fourth edition): three-volume set[M]. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [15] Kang X Y, Li C Q, Luo Y. Cloning of pAhX22, a small cryptic plasmid from *Aeromonas hydrophila*, and construction of a pAhX22-derived shuttle vector[J]. *Plasmid*, 2020, 108: 102490.
- [16] Furmanek-Blaszk B. Phenotypic and molecular characteristics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from the River Nile[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(7-8): 547-552.
- [17] Han J E, Kim J H, Choresca Jr C H, *et al.* A small IncQ-type plasmid carrying the quinolone resistance (*qnrS2*) gene from *Aeromonas hydrophila*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 54(4): 374-376.
- [18] Majumdar T, Das B, Bhadra R K, *et al.* Complete nucleotide sequence of a quinolone resistance gene (*qnrS2*) carrying plasmid of *Aeromonas hydrophila* isolated from fish[J]. *Plasmid*, 2011, 66(2): 79-84.
- [19] Han J E, Kim J H, Choresca C H, *et al.* First description of ColE-type plasmid in *Aeromonas* spp. carrying quinolone resistance (*qnrS2*) gene[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55(4): 290-294.
- [20] Boyd J, Williams J, Curtis B, *et al.* Three small, cryptic plasmids from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449[J]. *Plasmid*, 2003, 50(2): 131-144.
- [21] Weingarten R A, Johnson R C, Conlan S, *et al.* Genomic analysis of hospital plumbing reveals diverse reservoir of bacterial plasmids conferring carbapenem resistance[J]. *American Journal of Microbiology*, 2018, 9(1): e02011-e02017.
- [22] Nadiga M, Vaidyanathan V V, Thayumanavan T. Draft genome sequence of *Aeromonas dhakensis* strain F2S2-1, isolated from the skin surface of an Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*)[J]. *Genome Announcements*, 2016, 4(4): e00494-e00516.
- [23] Majumdar T, Chattopadhyay P, Saha D R, *et al.* Virulence plasmid of *Aeromonas hydrophila* induces macrophage apoptosis and helps in developing systemic infection in mice[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2009, 46(2): 98-107.
- [24] Bello-López J M, Vázquez-Ocampo N J, Fernández-Rendón E, *et al.* Inability of some *Aeromonas hydrophila* strains to act as recipients of plasmid pRAS1 in conjugal transfer experiments[J]. *Current Microbiology*, 2012, 64(4): 332-337.
- [25] Halary S, Leigh J W, Cheaib B, *et al.* Network analyses

- structure genetic diversity in independent genetic worlds[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(1): 127-132.
- [26] Strahilevitz J, Jacoby G A, Hooper D C, *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2009, 22(4): 664-689.
- [27] Chen X, Zhang W Q, Pan W J, *et al.* Prevalence of *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA* and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(6): 3423-3427.
- [28] Zhang R, Ichijo T, Huang Y L, *et al.* High prevalence of *qnr* and *aac(6)-Ib-cr* genes in both water-borne environmental bacteria and clinical isolates of *Citrobacter freundii* in China[J]. *Microbes and Environments*, 2012, 27(2): 158-163.
- [29] Jiang X B, Yu T, Wu N, *et al.* Detection of *qnr*, *aac(6)-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* isolated from cooked meat products in Henan, China[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 187: 22-25.
- [30] Bickle T A, Krüger D H. Biology of DNA restriction[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1993, 57(2): 434-450.
- [31] Ueno T, Ito H, Kotani H, *et al.* Cloning and expression of the *NspV* restriction-modification genes of *Nostoc* sp. strain PCC7524[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(16): 3899.
- [32] Sørum H, L'Abée-Lund T M, Solberg A, *et al.* Integron-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(4): 1285-1290.
- [33] McIntosh D, Cunningham M, Ji B J, *et al.* Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 61(6): 1221-1228.
- [34] Smillie C, Garcillán-Barcia M P, Francia M V, *et al.* Mobility of plasmids[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(3): 434-452.
- [35] 王鹏霞. 苏云金芽胞杆菌 YBT-1518 内生质粒 pBMB0228 的分离融合机制 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013. Wang P X. The mechanism of resolution and regeneration of a native plasmid pBMB0228 from *Bacillus thuringiensis* YBT-1518[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [36] 周光, 周群兰, 谢骏, 等. 嗜水气单胞菌流行病学研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(23): 14149-14151. Zhou G, Zhou Q L, Xie J, *et al.* Research advances of *Aeromonas hydrophila* epidemiology[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(23): 14149-14151(in Chinese).
- [37] 乔毅, 万夕和, 沈辉. 我国水产用抗菌药物耐药性研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2015, 40(5): 389-395. Qiao Y, Wan X H, Shen H. Research progress in antibacterial drugs resistance of Chinese aquaculture industry[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2015, 40(5): 389-395(in Chinese).
- [38] 丁正峰, 薛晖, 王晓丰, 等. 江苏主要水产病原菌耐药谱系监测[J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(2): 344-347. Ding Z F, Xue H, Wang X F, *et al.* Monitoring of drug resistance spectrum in aquatic pathogens in Jiangsu Province[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2011, 39(2): 344-347(in Chinese).
- [39] Merve B, Nurşen B. Importance of antibiotic residues in animal food[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 125: 462-466.

Cloning and functional identification of an endogenous plasmid pAhW39 from quinolone-resistant *Aeromonas hydrophila* isolated from fish

KANG Xingyu¹, WANG Chaojie¹, WANG Zhicheng¹, WANG Weimin¹, LUO Yi^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: *Aeromonas hydrophila* is one of the main opportunistic pathogens in aquaculture. Quinolones are one of the main fishery antibiotics. However, the frequent and unreasonable use of quinolones has led to the emergence of bacterial resistance. The research on the molecular characteristics of quinolone resistant plasmid of *Aeromonas* spp. is still in the initial stage. In this study, to investigate the relationship between endogenous plasmids and quinolone-resistant phenotype of *A. hydrophila* isolates, a plasmid termed pAhW39, from a quinolone-resistant *A. hydrophila* strain W39 which was isolated from a diseased *Megalobrama amblycephala* from a fish farm in Xiantao, Hubei Province, was cloned and characterized. pAhW39 was 6 739 bp long, had a GC content of 46.13%, and contained four putative open reading frames (ORFs) (*nspv*, *nspV-like*, *repB* and *qnrS2*). The GC content of pAhW39 was lower than the GC content of the currently published *A. hydrophila* chromosomal DNAs which ranged from 60.1% to 62.0%, suggesting a possibility that the plasmid pAhW39 might originate from other strains through the horizontal transfer of plasmids. *nspV* and *nspV-like* encoded type II endonucleases NspV and NspV-like, respectively. The *repB* encoded a replication protein RepB and *qnrS2* encoded a quinolone resistance protein QnrS2 which usually confers increased resistance to quinolones. pAhW39 was stable in *A. hydrophila* strain W39 in the absence of selective pressure. Compared with plasmid pAhW39 elimination strain W39-C, the minimum inhibitory concentrations of nalidixic acid and ciprofloxacin against strain W39 were increased 16-fold and 8-fold, respectively, indicating that the plasmid pAhW39 containing *qnrS2* might mediate the resistance of strain W39 to quinolones. Comparative genomics analyses revealed that the plasmid pAhW39 had 99.9% DNA sequence identity over its whole length with the plasmid pAER-e58e from *Aeromonas* sp. strain ASNIH2 isolated from wastewater from a hospital in Maryland, USA. The result implied that plasmid pAhW39 (or pAER-e58e) was widespread and stable, and reminded us that the existence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas* spp. in fish might cause a more widespread dissemination of resistance to quinolones in aquaculture. This should attract more attention.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; endogenous plasmids; sequence cloning; resistance; quinolone

Corresponding author: LUO Yi. E-mail: luoyi@mail.hzau.edu.cn

Funding project: National Natural Science Foundation of China (31570078)