



对虾养殖场底泥中副溶血性弧菌的接合型质粒多样性及其与毒力之间的关系

郝婧薇^{1,2}, 华昕彤^{1,2}, 傅松哲^{1,2*}, 周 灿^{1,2}, 刘 鹰^{1,2}, 胡惠秩³

(1. 大连海洋大学海洋科技与环境学院, 辽宁 大连 116023;

2. 大连海洋大学, 设施渔业教育部重点实验室, 辽宁 大连 116023;

3. 湖北大学环境与资源学院, 湖北 武汉 430062)

摘要: 为了阐明引起急性肝胰腺坏死病 (acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND) 副溶血性弧菌的接合型质粒在对虾养殖环境中的遗传多样性, 实验从中国 5 个沿海省份的对虾场收集了 100 个底泥样品, 以质粒上编码接合转移蛋白的保守基因为目标, 利用 PCR 法检测相关质粒的存在情况, 并对质粒进行测序。结果显示, 100 个样品中有 39 个样品含有质粒的接合转移蛋白片段。从 100 个底泥样品中分离出 15 株副溶血性弧菌, 其中 13 株含有 1~2 个质粒。质粒序列测序结果显示, 这些质粒可分为 8 种类型/谱型, 其中 7 种不携带 *pirAB*, 但均含有编码接合转移的基因簇。根据分离副溶血性弧菌携带质粒的 8 种谱型, 分别选择 8 株副溶血性弧菌进行凡纳滨对虾攻毒实验, 发现这些菌株对凡纳滨对虾的毒性有显著差异, 实验虾死亡率为 15%~100%。只有 *pirAB* 阳性菌株会对实验虾产生 AHPND 症状, 死亡率为 100%。对质粒组成进行分析表明, 质粒之间遗传物质交换频繁, 大部分质粒的遗传组成都来自一个 183 kb 的超大质粒 pVP2HP。综上, 本实验通过探究对虾养殖场底泥中结合性质粒的多样性, 增强了人们对副溶血性弧菌质粒遗传多样性及其与 AHPND 关系的理解, 为 AHPND 的防控提供了理论支持。

关键词: 对虾; 养殖; 急性肝胰腺坏死病 (AHPND); 副溶血性弧菌; 质粒多样性

中图分类号: S 945.1⁺²

文献标志码: A

对虾急性肝胰腺坏死病 (acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND) 于 2010 年首次在我国和越南对虾养殖场暴发, 其发病时间短、传染性强、致死率高, 随后在东南亚和南美洲广泛流行^[1], 对全球对虾养殖业造成严重威胁, 到目前为止累计造成的经济损失高达数百亿美元^[2]。研究发现, AHPND 的病原体是一类特定的副溶血性弧菌, 虾池底泥中可分离出引起 AHPND 的副溶血性弧菌^[3]。大多数引起 AHPND 的菌株都携带

发光杆菌二元毒素 (*pirAB*) 的特定质粒^[4], 几乎在所有引起 AHPND 的副溶血性弧菌 (*Vp_{AHPND}*) 中都发现了特异质粒性 pVA1^[5-7], 且在其他弧菌中也有发现, 同时该质粒可在弧菌之间传播, 如欧文氏弧菌 (*V. owensii*)^[8] 和坎贝尔弧菌 (*V. campbellii*)^[9]。Dong 等^[10] 研究发现这种特定质粒主要通过接合转移方式在不同弧菌中传播。然而, Xiao 等^[11] 研究发现, 这一接合转移元件并非在 pVA1 所独有。因此有必要研究养殖环境中携带接合转移元件的所

收稿日期: 2021-03-08 修回日期: 2021-12-31

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0900500); 辽宁省教育厅科研经费 (QL202005); 广东省重点研发计划 (2019B020215001, GML2019ZD0402); 国家自然科学基金 (81903372)

第一作者: 郝婧薇 (照片), 从事环境微生物研究, E-mail: haojingw@foxmail.com

通信作者: 傅松哲, 从事环境微生物研究, E-mail: fusongzhe@dlo.edu.cn



有接合型质粒的遗传多样性, 以便了解 pVA1 质粒可能的形成机制。

与 AHPND 相关的质粒中, *pirAB* 的两侧均携带一段大小为 3.5 kb 的反向重复序列 *pirAB*-Tn903 复合转座子^[11]。此外, Han 等^[12] 在 AHPND 症状的对虾中同时分类获得 *pirAB* 阳性的弧菌菌株, 以及 2 种类型的 *pirAB* 缺失突变体菌株, 或缺失整个 *pirAB* 转座子, 或缺失 *pirB* 基因。

据报道, 除了 pVA1 外, Vp_{AHPND} 中还存在大量 *pirAB* 阴性质粒^[10, 13]。通过质粒分析发现, 这些 *pirAB* 阴性质粒编码接合转移蛋白的基因簇非常保守, 并且与 *pirAB* 阳性质粒的基因相似度在 98% 以上^[11]。本团队鉴定了虾源副溶血性弧菌中的一些 *pirAB* 阴性质粒, 如 pFORC22(CP013250.1) 和 pFORC4(CP009849.1), 发现它们与 AHPND 参考质粒 pVA-1 有 40%~46% 的 DNA 序列相似性^[14], 但它们与 pVA-1 的遗传关系以及是否具有致病性仍不清楚, 这严重影响了对 AHPND 疾病的认识。

大多数 pVA-1 相关的质粒在功能上可以分为 4 个部分^[14]。第一部分由编码 *tra* 接合转移和分泌基因组成 (相对 pVA-1 位于 0~24 828 和 48 532~70 382), 并且与大多数研究的质粒共享, 本研究中命名为片段 1。剩余的 24.6 kb 区域被分成 3 个片段, 分别为编码复制的 DNA 序列 (相对于 pVA-1 位于 24.8~33 kb)、一个 3.5 kb 的 *pirAB*-Tn903 复合转座子和一个与质粒维护和控制相关的 13 kb 区域, 分别命名为片段 2、3 和 4。此外, 菌株 VPE61 中发现了一个大小为 183 kb 的质粒, 它由一个与 pVA-1 相同的 69 kb 的 DNA 序列和一个特有的 114 kb 的 DNA 序列组成, 命名为片段 5^[15]。

为了解环境中 Vp_{AHPND} 的质粒遗传多样性, 实验进行了现场调查, 从沉积物中分离出 Vp_{AHPND} , 并对其含有的 *pirAB* 阳性和 *pirAB* 阴性质粒进行了测序, 分析片段 1~5 的基因含量分布, 以确认质粒之间是否存在遗传交换。研究结果有助于深入理解对虾养殖环境中质粒进化与 AHPND 的关系, 促进 AHPND 防治的发展。

1 材料与方法

1.1 样本采集、取样和 DNA 提取

为调查该质粒在国内 AHPND 感染地区的流行情况, 在 5 个沿海省份中选择了 8 个采样点: 沧州 (河北)、潍坊 (山东)、如东 (江苏)、赣榆 (江苏)、杭州 (浙江)、宁波 (浙江)、宁德 (福建) 和漳

浦 (福建) (图 1)。2014—2016 年, 从日龄 45~130 d 不等的凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖池底取样, 每组沉积物样品均采集 5 个样本 (4 个角点和 1 个中心点, $n=5$), 共收集 100 个样本^[3]。通过计算固定池大小的患病率计算沉积物样品中 *pirAB* 的流行率, 并使用 EpiTools 进行估算^[16]。

若发病率极低 ($<0.1\%$), 则可假设每个阳性池中只有 1 个阳性样品。令养殖池的大小为 k , 阳性池的数量为 x , 测试总数为 m , 根据 Cowling 等^[16] 的方法, 沉积物中副溶血性弧菌流行率 ($\hat{\pi}$) 的最大似然估计 (MLE) 为:

$$\hat{\pi}_{\text{MLE}} = 1 - \left(1 - \frac{x}{m}\right)^{1/k} \quad (1)$$

式中, x (阳性池数) 符合二项分布的特征, 渐进方差计算见公式 (2):

$$\text{Var}(\hat{\pi}_{\text{MLE}}) = \frac{(x/m)(1-x/m)^{2/k-1}}{k^2 m} \quad (2)$$

将沉积物重悬于 600 μL CTAB 缓冲液 (2% CTAB, 2% PVP, 1.4 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0 和 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)。通过改良的苯酚/氯仿方法提取 DNA, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 24 h 后, 使用 Nanodrop 进行 DNA 的质量和浓度检测^[17]。

1.2 AHPND 相关质粒和 *pirAB* 的 PCR 分析

使用引物 VpPirA-284F、VpPirA-284R、VpPirB-392F 和 VpPirB-392R 对 5 个测序菌株中的 *pirAB* 进行 PCR 扩增 (表 1)。将菌株培养液通过 0.22 μm 的滤器过滤, 得到各菌株的蛋白质产物, 利用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检查蛋白质产物, 并用考马斯亮蓝 G-250 染色, 查看蛋白质条带^[21]。

有研究发现, 基因 pVA_1011 在所有 pVA-1 质粒中都非常保守, 可作为质粒检测主链。

1.3 凡纳滨对虾的攻毒实验

实验用凡纳滨对虾购自大连, 运回后置于体积为 50 L 的养殖池中暂养, 在实验环境下驯化 1 周, 自然光照周期, 水温 (28 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 盐度为 30, pH 为 7.8, 期间不间断进行曝气, 使用虾饲料定时投喂对虾, 每天清理粪便、残饵并适当补加海水, 每天换水 50%。驯化结束后, 挑选初始体重为 (1.00 ± 0.26) g, 体长为 (5.20 ± 0.57) cm, 活力好、体色透明的健康个体, 每个养殖池 30 尾。

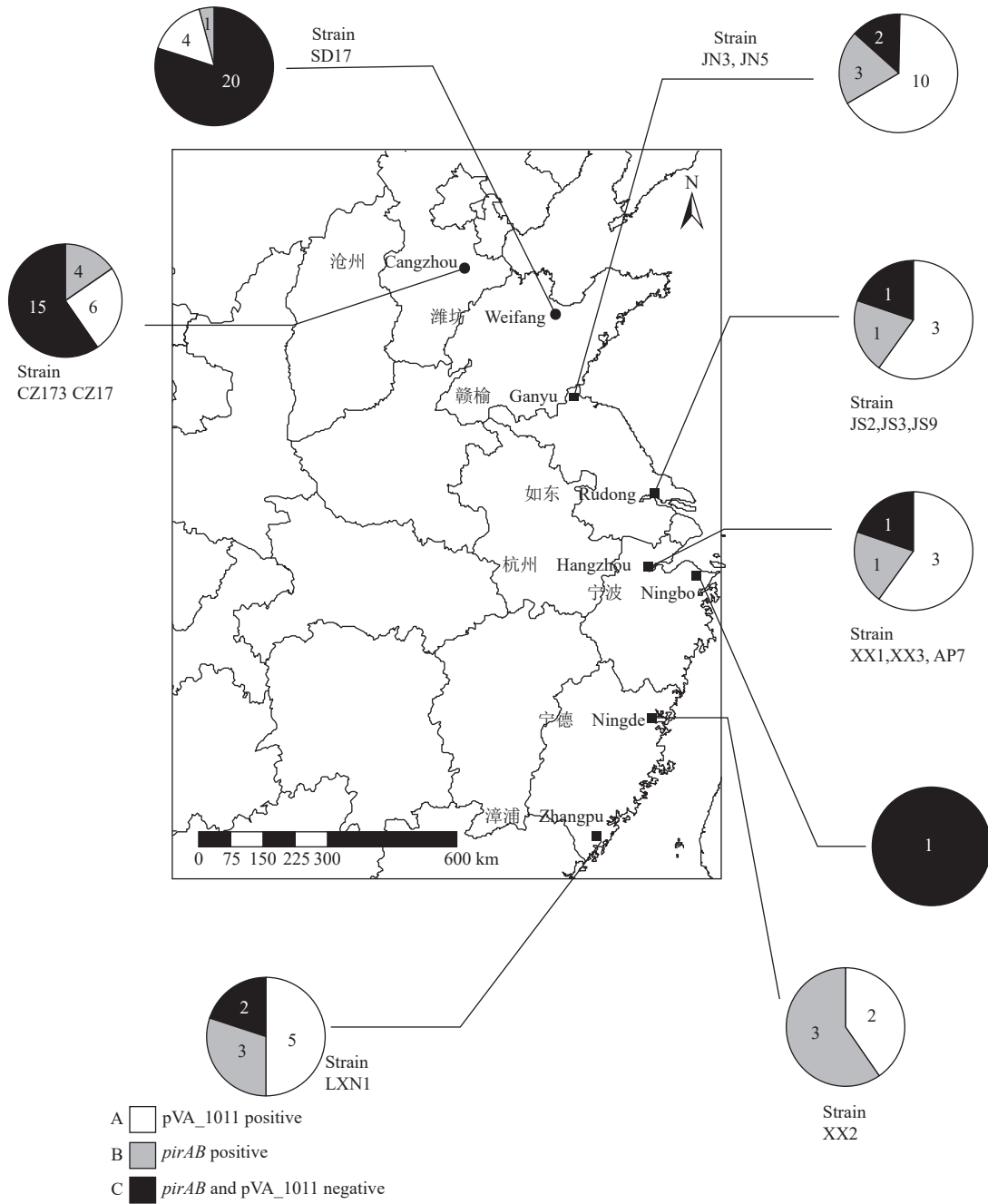


图 1 采样点位置示意图

黑点表示采样虾场的位置, *pirAB* 阴性和 *pirAB* 阳性质粒的检测率在饼图中表示。

Fig. 1 Diagram of sampling sites of the shrimp farms

Location of 8 sampled shrimp farms was indicated as a black point while the detection rate of *pirAB*-negative and *pirAB*-positive plasmid was indicated in the pie chart.

将副溶血性弧菌在 28 °C 恒定搅拌 (120 r/min) 的大豆胰蛋白胨培养液 (TSB) 中培养至 OD₆₀₀ 达到 0.8, 然后将菌悬液调节至 1×10⁸ CFU/mL, 将 20 尾虾在 4 L 持续曝气的悬浮液中浸泡 15 min, 阴性对照组的虾浸入无菌的 TSB 中, 将浸泡后虾和细菌悬浮液直接转移到装有 20 L 干净海水的养

殖池中, 细菌浓度约为 1×10⁶ CFU/mL, 在 48 h 内每 2 小时记录 1 次累积死亡率^[2]。结果用平均值±标准差 (mean±SD) 表示。所有实验均重复 3 次。

本研究获得了大连海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会批准 (DLOU2020-16), 实验过程中操作人员严格遵守大连海洋大学实验动物相关

表 1 本研究中使用的 PCR 引物
Tab. 1 PCR primers used in this study

基因 genes	引物 primers	序列(5'—3') sequences (5'—3')	扩增片段长度/bp size of amplicon	参考文献 references
16S <i>rDNA</i>	27F	AGAGTTTGATCC TGGCTCAG	1 360	[18]
	1492R	GATACCTTGTTACGACTT		
<i>tlh</i>	<i>tlh</i> -f	CATTACTCCCGCTTGCTTCTG	113	[19]
	<i>tlh</i> -r	GCGAACATAGGTATAGGTTTGGTT		
pVA1011	pVA1011_F1	TCAGCGCGCCCTCAAAATCA	178	本实验 this study
	pVA1011_R1	GAGCCCTTGCGTGGGGATAC		
<i>pirA</i>	VpPirA-284F	TGACTATTCTCACGATTGGACTG	284	[4]
	VpPirA-284R	CACGACTAGCGCCATTGTTA		
<i>AP4</i>	AP4-F1	ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC	1 269	[20]
	AP4-R1	ACGATTTTCGACGTTCCCAAA		
	AP4-F2	TTGAGAATACGGGACGTGGG	230	
	AP4-R2	GTTAGTCATGTGAGCACCTTC		
<i>pirB</i>	VpPirB-392F	TGATGAAGTGATGGGTGCTC	392	[4]
	VpPirB-392R	TGTAAGCGCCGTTAACTCA		

伦理规范, 并按照大连海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.4 质粒的基因组测序和基因分析

挑取单个菌落, 在 5 mL TSB 中于 28 °C 培养过夜后, 使用质粒提取试剂盒 (TaKaRa, 中国) 提取过夜培养的质粒 DNA。质粒 DNA 由北京诺和致源生物信息技术有限公司利用 PacbioSMRT 测序平台进行测序, 使用 RAST 预测测序质粒的开放阅读框 (ORF), 通过国家生物技术信息中心 (NCBI) 使用 BlastP 进行相似序列查找; 使用 BRIG (version 0.95) 进行多质粒比较^[23]。

为了鉴定 pVA-1 质粒的共享基因, 将本研究中测序的质粒和 18 个公开质粒进行比较, 分别为 pVA1(KP324996)、pFORC22(CP013250.1)、pV110 (KY498540)、pFORC4(CP009849.1)、pVP2HP(AP 014859)、p1937-2(CP022246)、p1937-1(CP022245)、p1(CP034567.1)、pVp_Kor-D1-1(CP046413.1)、pVP-HB2014-1(CP034287.1)、pVPCZ2014-2(NZ_CP034 292.1)、pVPSD2016-1(CP034300.1)、pVPSD2016-3(NZ_CP034302.1)、pVPSD2016-5 (NZ_CP034304. 1)、p2(CP034568.1)、pVHvo-R(CP045862.1)、unnamed1(CP025798.1) 和 pMBL287(CP013487.1)。

将巨型质粒 pVP2HP 分为 2 部分: pVA-1 的大部分基因 (片段 1、2 和 4) 和一个 113 kb 区域^[15],

本实验将该 113 kb 区域的基因区域命名为片段 5。为了检测 5 个片段在其他质粒中的分布情况并阐明它们的进化关系, 对上述公开质粒和本研究中鉴定的质粒进行了基因含量分析。为确定独特基因的功能, 使用 BLASTn 在基因库非冗余核苷酸数据库中查找重叠群, 匹配阈值超过 85% 的基因可认定为相同基因, 由于每个质粒中的独特基因不能与 pVA1 (KP324996) 进行比对, 因此使用 progressiveMauve 2.3.1 软件进行鉴定, 并使用 BRIG (version 0.9) 软件进行多个质粒比较^[20]。

2 结果

2.1 对虾养殖场沉积物中 *pirAB* 和 pVA_1011 的流行情况

本研究从我国东部的 5 个省 (也是主要的虾类养殖区) 收集了 100 个沉积物样本 (图 1)。为研究沉淀物中 *pirAB* 和 pVA-1 质粒主干片段在沉积物中的流行情况, 使用引物对 AP4 和 pVA1011_F1/R1 验证 *pirAB* 和编码接合转移蛋白基因 pVA_1011 的存在, 筛选含阳性质粒的沉积物样品。对新引物扩增 *pirAB* 阳性质粒 p1937-1 和 *pirAB* 阴性质粒 p1937-2 中的 pVA1011_F1/R1 的有效性进行了验证。结果显示, *pirB* 和 pVA_1011 在 p1937-1 中均扩增出 178 bp 的阳性条带, 而阴性对照

p1937-2 没有扩增出相应的条带 (图 2), 说明该对引物可以用于下一步实验。

沉积物中 39% 的样品呈现 pVA_1011 阳性, 只有 16 个具有 *pirB*。pVA_1011 的阳性率在宁德地区最高 (100%), 其次是赣榆地区 (15 个中有 10 个, 占 66.7%), 宁波地区样本中未发现 pVA_1011。赣榆地区 *pirAB* 的流行率最高 (20%)。pVA_1011 和 *pirAB* 的预期流行率分别为 50.9% (95% CI: 33.8%~73.3%) 和 13.85% (95% CI: 5.32%~26.3%) (表 2)。

2.2 沉积物中副溶血性弧菌的分离

为了获得质粒, 进一步分析了 39 个 pVA_1011 阳性质粒的分离株。使用 TCBS 平板进行菌株分离, 共分离到 15 个绿色菌落, 包括赣榆 4 株 (JN3/JN5/XX1/XX3), 如东 4 株 (JS2/JS3/JS5/JS9),

沧州 2 株 (CZ17/CZ173), 潍坊 1 株, 另外在杭州、宁德和漳浦样品中分离出 4 株, 在 TSA 平板上纯化, 随后对菌株的 16S *rRNA* 进行 PCR 扩增和序列分析, 以确定其分类地位。结果显示, 15 株菌株的 16S *rDNA* 与副溶血性弧菌的序列相似性超过 99.5%, 且均为 *tlh* 阳性, 副溶血性弧菌的预期流行率为 11.19% (95% CI: 3.43%~22.84%, 表 3)。

2.3 质粒的测序和鉴定

为确认分离菌株中是否存在 *pirAB* 和质粒骨架片段, 使用 SDS-PAGE 和 PCR 检测二元毒素 *pirA^{vp}/pirB^{vp}*。PCR 产物的电泳结果显示, 5 株菌株均获得了 *pirA* (284 bp) 和 *pirB* (392 bp) 的阳性扩增子 (图 3-a)。通过 SDS-PAGE 对 5 株菌株的粗蛋白进行分析, 目标条带分子量大小分别约为 17 ku (PirA) 和 50 ku (PirB, 图 3-b)。

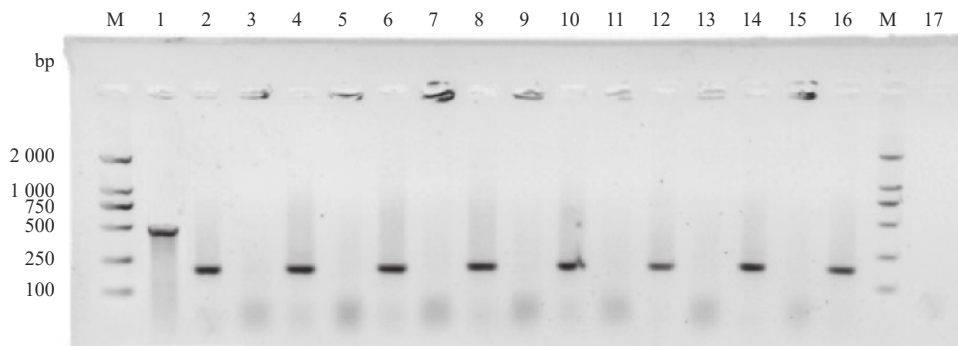


图 2 PCR 检测分离的副溶血性弧菌中 *pirB* 和 pVA_1011

M. Marker; 1~2. *pirB* 和 p1937-1 的 pVA_1011; 3~4. p1937-2 的 *pirB* 和 pVA_1011; 5~6. JN3 的 *pirB* 和 pVA_1011; 7~8. JN5 的 *pirB* 和 pVA_1011; 9~10. JS2 的 *pirB* 和 pVA_1011; 11~12. JS3 的 *pirB* 和 pVA_1011; 13~14. JS3 的 *pirB* 和 ORF11; 15~16. AP7 的 *pirB* 和 pVA_1011; 17. 阴性对照。

Fig. 2 PCR detection of *pirB* and pVA_1011 in isolated *V. parahaemolyticus*

M. Marker; 1-2. *pirB* and gene pVA_1011 of p1937-1; 3-4. *pirB* and pVA_1011 of p1937-2; 5-6. *pirB* and pVA_1011 of JN3; 7-8. *pirB* and pVA_1011 of JN5; 9-10. *pirB* and pVA_1011 of JS2; 11-12. *pirB* and pVA_1011 of JS3; 13-14. *pirB* and ORF11 of JS3; 15-16. *pirB* and pVA_1011 of AP7; 17. negative control.

表 2 采样点概况

Tab. 2 General information of sampling sites

省份 provinces	取样地点 sampling sites	样本数量/份 no. of samples	<i>pirAB</i> 阳性检出数/份 positive detection of <i>pirAB</i>	pVA_1011 阳性检出数/份 positive detection of gene pVA_1011
河北 Hebei	沧州 Cangzhou	25	4	10
山东 Shandong	潍坊 Weifang	25	1	5
江苏 Jiangsu	赣榆 Ganyu	15	3	10
	如东 Rudong	5	1	3
浙江 Zhejiang	杭州 Hangzhou	5	1	1
	宁波 Ningbo	10	0	0
福建 Fujian	漳浦 Zhangpu	10	3	5
	宁德 Ningde	5	3	5

表 3 沉积物中副溶血性弧菌的预期流行率

Tab. 3 Estimated pooled prevalence of *V. parahaemolyticus* in the sediments

项目 items	pVA_1011	<i>pirAB</i>	副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>
阳性数量/个 positive pools	39	16	15
阴性数量/个 negative pools	61	84	86
检测数量/个 tested pools	100	100	100
预期流行率/% estimated prevalence	50.9	13.85	12.51
置信区间(2.5%~97.5%) confidence interval	33.8~73.3	5.3~26.3	4.4~24.6
标准误 SE	9.50	4.94	4.76

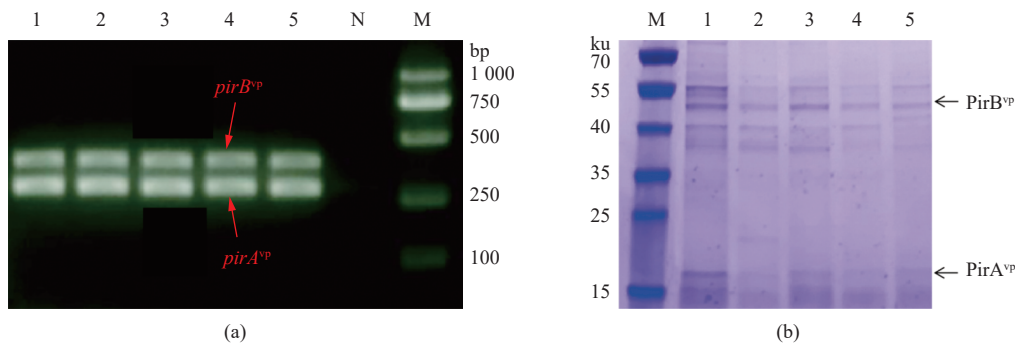


图 3 不同 V_{pAHPND} 中 *pirA* 和 *pirB* 的表达情况

(a) 凝胶电泳图, (b) 不同的 V_{pAHPND} 中 PirA 和 PirB 样品在 10% SDS-PAGE 中的存在情况; 1. 菌株 CZ173, 2. 菌株 ZP8, 3. 菌株 JS5, 4. 菌株 LXN1, 5. 菌株 CZ17, N. 非模板对照, M. DL2000 Marker.

Fig. 3 PCR confirmation of *pirA* and *pirB* sequences in different V_{pAHPND} isolates

(a) gel electrophoresogram, (b) determination of binary toxins PirA and PirB in the broth of different V_{pAHPND} isolates by 10% SDS-PAGE; 1. strain CZ173, 2. strain ZP8, 3. strain JS5, 4. strain LXN1, 5. strain CZ17, N. non-template control, M. DL2000 molecular weight standards.

对 pVA_1011 基因进行验证, 发现有 7 株菌株呈现阳性结果 (图 2), 分别为 AP7、JN-3、JN-5、JS2、JS3、JS9 和 XX1。为得到质粒基因组, 进行质粒提取并测序。测序结果发现, 13 株菌株中都含有 1~2 个质粒, 与 PCR 结果一致, 5 株菌株 (ZP8、CZ173、CZ17、LXN-1 和 JS5) 携带 AHPND 相关质粒, 即 pZP8、pVPCZ173-1、pVPCZ17-1、pLXN-1 和 pJS5, 与质粒 pVA-1 (KP324996) 有 99% 的 DNA 序列相似性。此外, 菌株 CZ173 携带质粒 pVPCZ173-2, 其对质粒 pVP2HP (AP014859.1) 的 DNA 相似性为 67%。同样, 菌株 CZ17 含有另一个 106 kb 质粒 pVPCZ17-2, 与质粒 pVP2HP DNA 相似性为 100% (表 4)。

另外, 8 株菌株各携带一个 *pirAB* 阴性质粒, 即 pPSD17-1、pPA7-1、pJN3、pJN5、pJS2、pJS3、pJS9 和 pXX-1。pVPSD17-1 的大小为 76 kb, 含有 3 个杀虫毒素 (tc) 基因 (2 818~17 582 bp), 其与质粒 pVP2HP 的 DNA 相似性仅为 11%/97% (AP014859.1)。从浙江分离到的 pAP7-1 与质粒

p1937-2 的 DNA 相似性为 98%/99%, 表明浙江和福建的菌株之间可能存在质粒转移。

pJN3 和 pJN5 仅存在 2 个碱基差异, 而 pJS2 和 pJS9 的 DNA 序列相似性为 100%。质粒 pJN3 和 pJN5 具有 111 个 ORF, 其中 34 个为编码接合转移的基因。pJN3 和 pJN5 包含一个编码复制起始蛋白 (Rep) 的基因, 与 pVA-1 质粒中的 Rep 相比, DNA 相似性超过 99%, 超过 836 个核苷酸有 96% 的相似性。pJN3 与 pVP2HP 相比覆盖率为 84%, DNA 相似性为 99%。

质粒 pJS2、pJS3 和 pJS9 有 144 个 ORF, 分别包括 20 个编码接合转移的基因。pJS2、pJS3 和 pJS9 与 pVP2HPd 的覆盖率相比为 76%, DNA 相似性为 99%, 但与 pVA-1 的同源性较低 (覆盖率为 16%, DNA 相似性 99%), 较 pVA-1 和 pVP2HP 缺失 20 个基因, 其中多数与任何已知基因均无同源性, 因此其功能未知。pJS2、pJS3、pJS9 之间仅与片段 1 共享 27 kb 的基因。此外, 11 kb 处的基因起始于位点特异性重组酶, 表明该区域是通

表 4 从沉积物中分离到的副溶血性弧菌及其质粒相关信息

菌株 strains	取样地点 locations	质粒名称 plasmid name	质粒大小/kb size	<i>pirAB</i>	最高覆盖率/% highest coverage	最大DNA相似性/% highest identity	相似质粒 similar plasmid	登录号 accession no.
JN3	赣榆 Ganyu	pJN3	94	—	84	99	pVP2HP	AP014859.1
JN5	赣榆 Ganyu	pJN5	94	—	84	99	pVP2HP	AP014859.1
JS2	如东 Rudong	pJS2	128	—	76	99	pVP2HP	AP014859.1
JS3	如东 Rudong	pJS3	128	—	76	99	pVP2HP	AP014859.1
JS5	如东 Rudong	pJS5	67	+	99	97	pVA1	KP324996
JS9	如东 Rudong	pJS9	128	—	76	99	pVP2HP	AP014859.1
XX1	赣榆 Ganyu	pXX1	77	—	7	99	pVA1	KP324996
ZP8	漳浦 Zhangpu	pZP8	67	+	99	99	pVA1	KP324996
LXN-1	漳浦 Zhangpu	pLXN-1	68	+	99	99	pVA1	KP324996
AP7	杭州 Hangzhou	pAP7-1	78	—	100	99	p1937-2	CP022246
CZ173	沧州 Cangzhou	pVPCZ173-2	106	—	67	99	pVP2HP	AP014859.1
		pVPCZ173-1	71	+	100	99	pVA1	KP324996
CZ17	沧州 Cangzhou	pVPCZ17-1	71	+	100	99	pVA1	KP324996
		pVPCZ17-2	106	—	67	99	pVP2HP	AP014859.1
SD17	潍坊 Weifang	pVPSD17-1	76	—	11	97	pVP2HP	AP014859.1
XX3	赣榆 Ganyu	—	—	—	—	—	—	—
XX2	宁德 Ningde	—	—	—	—	—	—	—

注: —, 不存在, +, 存在。
Notes: —, absence, +, presence.

过重组获得的。

质粒 pXX-1 有 106 个 ORFs, 只有 4 个与接合转移相关的基因, 相对于 pVA-1 只有 7% 的覆盖率, 没有大部分接合转移区。

2.4 攻毒实验

使用 9 个携带 *pirAB* 的阳性分离株对凡纳滨

对虾进行攻毒实验。结果发现, 所有实验组的对虾均在 6 h 内开始出现典型的 AHPND 体征, 包括软壳、苍白的萎缩性肝胰腺 (HP)、空肠空胃、内容物不连续或没有内容物, 从接种后 12 h (hours post inoculation, 12 hpi) 开始发生大规模死亡 (图 4-a)。表明不同菌株引起的累积死亡率差异极大, 菌株 CZ173 的毒力最强, 其次是 LXN-1、JS5

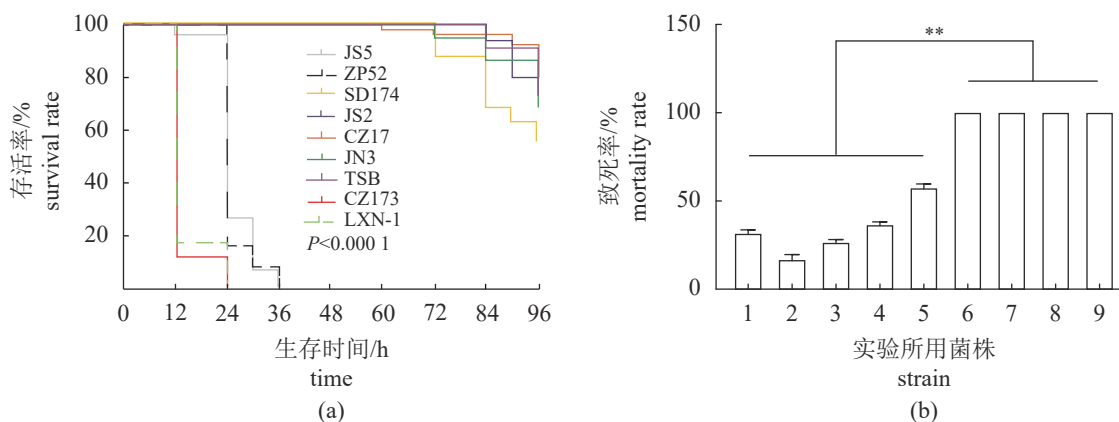


图 4 含有不同质粒的副溶血性弧菌的毒力不同

(a) 攻毒实验对虾的存活率, (b) 凡纳滨对虾攻毒后的最终存活率, 1. TSB, 2. CZ17, 3. JS2, 4. JN3, 5. SD1746, 6. JS5, 7. ZP8, 8. CZ173, 9. LXN-1; **, 差异极显著。

Fig. 4 Distinct virulence level of *V. parahaemolyticus* strains with different plasmid profile

(a) survival rate of shimp challenged with *V. parahaemolyticus*, (b) the final mortality rate of *L. vannamei* challenged with eight strains in the immersion bioassay, 1. TSB, 2. CZ17, 3. JS2, 4. JN3, 5. SD1746, 6. JS5, 7. ZP8, 8. CZ173, 9. LXN-1; **, extremely significant difference.

和 ZP8。携带 *pirAB* 阴性质粒的菌株的毒力明显较弱, 96 h 内的死亡率为 10%~30% ($P < 0.01$)。非 *pirAB* 菌株 SD17 以及其他 *pirAB* 阴性菌株和对照组中没有观察到 AHPND 症状, 而且 *pirAB* 阴性菌株之间毒力差异并不显著 (图 4-b)。

2.5 质粒组成成分分析

为阐明质粒的基因结构, 以编码接合转移元件的序列在 NCBI 进行 BLASTN 搜索, 共发现 18 种不同类型含有接合转移元件的质粒, 分别为 pVA1 (KP324996)、pFORC22(CP013250.1)、pV110(KY 498540)、pFORC4(CP009849.1)、pVP2HP(AP0148 59)、p1937-2(CP022246)、p1937-1(CP022245)、p1 (CP034567.1)、pVp_Kor-D1-1(CP046413.1)、pVPHB 2014-1(CP034287.1)、pVPCZ2014-2(NZ_CP034292. 1)、pVPSD2016-1 (CP034300.1)、pVPSD2016-3 (NZ_CP034302.1)、pVPSD2016-5(NZ_CP034304.1)、p2 (CP034568.1)、pVHvo-R (CP045862.1)、unnamed1 (CP025798.1) 和 pMBL287 (CP013487.1) 和 1 个 S172 中的质粒重叠群 (AWHI01000014.1)^[14]。在此基础上, 进一步分析了以上质粒序列中 5 个片段的分布 (图 5)。为进一步研究片段 5 在质粒中的分布, 对片段 5 进行基因分析, 发现其有 6 个位点特异性重组酶和几个转座子, 根据重组酶和转座子位置, 实验将片段 5 分为 8 个部分 (F5-1~F5-8), 片段 5 以假定蛋白为主, 还包含可移动元件、接合转移蛋白等。

由于 pXX-1 和 pVPSD17-1 几乎不含片段 1

和 5, 因此不进行下一步分析。分析结果显示 pVP2HP 质粒相对于 pVA-1 具有镶嵌结构; 遗传物质的供体主要来自片段 1 和 5 (表 5)。相对于 pVA-1, 研究对象中都含有用于接合转移和分泌的完整或不完整的基因片段 (属于片段 1), 质粒中常出现基因重排现象。片段 2~4 只存在于 pVA-1 代表的谱系中, 而片段 5 的基因含量在质粒中分布不均匀, 25.9% (7/27) 含有 F5-1, 18.5% (5/27) 含有 F5-2, 7.4% (2/27) 含有 F5-3, 7.4% (2/27) 含有 F5-4, 3.7% (1/27) 含有 F5-5, 18.5% (5/27) 含有 F5-6, 22.2% (6/27) 含有 F5-7, 11.1% (3/27) 含有 F5-8, 这极大地促进了 pVA-1 质粒的遗传多样性。

3 讨论

AHPND 给对虾产业造成了巨大的经济损失, 但 AHPND 相关质粒的存在及其在弧菌中的传播途径现在仍然未知。本研究通过收集 2014—2016 年河北、浙江、江苏、福建和山东这 5 个省出现 AHPND 的对虾养殖场的池底沉积物, 从中分离出 15 株副溶血性弧菌。底泥是弧菌的常见储存地, Yingkajorn 等^[24] 发现泰国大多数对虾养殖场中发生副溶血性弧菌的患病率及其浓度都很高。

结合 Enriquez-Espinoza 等^[3] 和 Chonsin 等^[25] 的研究, 发现在沉积物中常出现 *pirAB* 阴性质粒。本研究对沉积物中的 *pirAB* 测序后发现, 与 *pirAB* 阴性质粒相比, *pirAB* 阳性质粒的预期流行率在研究区域相对较低 (13.85%)。通过对 pVA_1011 进行 PCR 分析, 成功回收了除 XX2 和

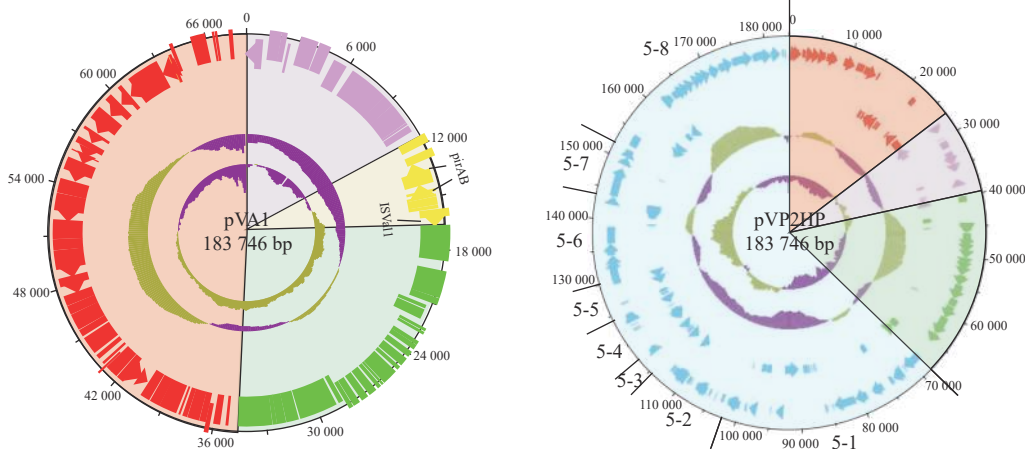


图 5 AHPND 相关质粒 pVA-1 和 pVP2HP 的基因含量划分

片段 1 为红色, 片段 2 为粉红色, 片段 3 为黄色, 片段 4 为绿色, 片段 5 为蓝色。

Fig. 5 Gene content division of AHPND-associated plasmid pVA-1 and pVP2HP

Fragment 1 in pVA1 represented in red, while fragment 2, 3, 4 and 5 are labeled as pink, yellow, green and blue, respectively.

表 5 质粒的遗传组成占比
Tab. 5 Genetic composition of investigated plasmids %

质粒名称 plasmid names	片段1 fragment 1	片段2 fragment 2	片段3 fragment 3	片段4 fragment 4	片段5 fragment 5	其他 others
副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>						
pVP2HP	58.33	10.29	0	14.57	100.34	F5-1、F5-2、F5-3、F5-4、F5-5、F5-6、F5-7、F5-8
pJS5/pZP52/pV110/LXN-1	38.70	5.34	9.62	14.41	0	
pVA-1/pVPCZ173-1/pVPCZ17-1	42.14	6.67	3.33	12.31	0	
pS172	55.35	0	0	0	13.14	F5-1
p1973-2/pAP7-1	37.03	0	0	0	19.23	F5-1
pJN3/pJN5	18.19	0	0	0	71.06	F5-1、F5-2、F5-6、F5-7
pFORC22	53.71	0	0	0	24.67	F5-3、F5-4、F5-7
pFORC4	40.80	0	0	0	6.43	F5-1
pJS2/pJS9	29.14	0	0	0	74.34	F5-2、F5-6、F5-7、F5-8
pCZ173-2/pCZ17-2	0	0	0	0	74.16	F5-2、F5-3、F5-4、F5-5、F5-6、F5-7、F5-8
pVPSD2016-1	9.92	1.78	0.34	0	16.41	F5-1、F5-2、F5-3、F5-5、F5-6、F5-7、F5-8
pVp_Kor-D1-1	8.75	1.77	0.34	0	16.33	F5-1、F5-2、F5-3、F5-5、F5-6、F5-7、F5-8
pVPHB2014-1	9.48	1.77	0.34	0	16.03	F5-1、F5-2、F5-3、F5-5、F5-6、F5-7、F5-8
p1	10.83	1.80	0	1.35	18.68	F5-1、F5-2、F5-7、F5-8
p2	10.59	1.66	0	0.57	16.41	F5-1、F5-2、F5-5、F5-7、F5-8
pVPCZ2014-2	0	0.35	0	1.51	1.11	
pVPSD2016-3	0.81	0	0	0	2.48	
pVPSD2016-5	17.07	12.53	5.51	11.50	19.37	F5-1、F5-2、F5-7、F5-8
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>						
pMBL287	9.28	1.78	0.39	0	2.45	
欧文氏弧菌 <i>V. owensii</i>						
unnamed1	5.23	11.99	0	2.16	2.24	
pVHvo-R	10.41	1.79	0	0.72	18.02	F5-1、F5-2、F5-6、F5-7、F5-8

XX3 以外的 *pirAB* 阴性质粒。本研究鉴定了 7 株菌株的质粒, 发现其与 pVA-1 的平均相似度为 54%。同样也有研究揭示了 *pirAB* 阴性质粒广泛存在于其他菌株中 (如 FORC_4、FORC_22)^[11, 14]。Theethakaew 等^[15]还发现, 菌株 2HP 有一个大小为 183 kb 的大质粒, 与 69 kb 的 pVA-1 质粒编码的基因相似, 但是, 在 183 kb 质粒中没有大小为 3.5 kb 的 *pirAB* 转座子。由此可见, *pirAB* 阴性质粒很可能遍布于中国沿海地区。

随后进行的攻毒实验证实, 副溶血性弧菌只有含有完整 *pirAB* 基因的质粒才会引起 AHPND 的症状, 而其他 *pirAB* 阴性的接合型质粒均不引起对虾的显著死亡。这之前 Lee 等^[7]的结论一致。

通过对质粒组成成分进行分析, 发现 *pirAB* 阴性质粒与 *pirAB* 阳性质粒之间除接合转移元件外, 还存在很多共享基因序列, 且大多数质粒含

有 pVP2HP 中的许多蛋白质编码基因。Theethakaew 等^[15]对质粒 pVP2HP 的出现提出了 2 种解释: ① 2 个不同的质粒之间可能发生同源重组, 通过 4 型接合转移基因簇将 2 个质粒整合到一个大质粒中; ② pVA-1 和其他与 AHPND 相关的质粒是通过从 pVP2HP 分离质粒进化而来的, 随后将 3.5 kb 转座子整合到 *pirAB* 阴性质粒中。

目前的研究尚无法证实 pVP2HP 的出现机制。但大多数质粒包含 pVA-1 中保守的接合转移区, 由此推断它们可能起源于相同祖先。此外, 对质粒中的 5 个参考片段 (片段 1~5) 质粒组成进行分析, 发现每个质粒均具有镶嵌结构, 并且都包含来自 pVP2HP 的基因, 只是比例不同。实验在质粒 pVP2HP 中发现, 片段 5 中的基因以重组酶和转座子为主, 因此片段 5 的每个片段可能都非常活跃, 可以自由转移并插入质粒中。此外, pJN-

3/pJN5 和 pFORC22 还有一些未知功能的基因, 这些基因可能与它们对不同环境的适应性相关, 但其具体功能需要后续实验进一步验证。

基因重排可以促进细菌进化, 通过重组和获得新基因可使基因组具有可塑性^[26], 二者都是促进细菌进化和遗传多样性的主要驱动力, 当细菌进入新环境时, 这二者快速扩张, 可以帮助菌株更好地适应环境。因此, 在未来研究中, 需要阐明基因重排是否是造成质粒遗传多样性的驱动力。本研究通过分析每种质粒的基因含量, 为 *pirAB* 阴性和 *pirAB* 阳性质粒之间的遗传交换提供了更好的见解。

4 结论

本研究从对虾养殖场的沉积物中分离出 15 株副溶血性弧菌, 发现它们具有独特的质粒谱。与其他公开质粒进行对比分析发现, 大部分质粒的遗传组成都来自一个 183 kb 的超大质粒 pVP2HP。其存在多种 *pirAB* 阴性质粒且遗传组成具有镶嵌结构。持续的重组和遗传交换是造成 *pirAB* 阴性质粒遗传多样性的主要原因。此外, 本研究还发现 *Vp_{AHPND}* 的毒力仅与 *pirAB* 阳性质粒有关, 这也增强了对毒力与质粒谱相关性的理解。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Kumar V, Roy S, Behera B K, *et al.* Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture[J]. *Toxins (Basel)*, 2021, 13(8): 524.
- [2] Tang K T J, Bondad-Reantaso M G. Impacts of acute hepatopancreatic necrosis disease on commercial shrimp aquaculture[J]. *Revue Scientifique et Technique*, 2019, 38(2): 477-490.
- [3] Enríquez-Espinoza T, Mendoza-Cano F, Encinas-García T, *et al.* Molecular epidemiology of selected infectious diseases caused by bacteria in juveniles and post-larvae of the white shrimp *Penaeus vannamei* from the north-western coast of Mexico[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(11): 1393-1397.
- [4] Han J E, Tang K T J, Lightner D. Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 115(3): 245-251.
- [5] Lai H C, Ng T H, Ando M, *et al.* Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 1006-1014.
- [6] Han J E, Tang K T J, Lightner D, *et al.* Phototransducin (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 113(1): 33-40.
- [7] Lee C T, Chen I T, Yang Y T, *et al.* The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112: 10798-10803.
- [8] Liu L, Xiao J, Xia X, *et al.* Draft genome sequence of *Vibrio owensii* strain SH-14, which causes shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease[J]. *Genome Announc*, 2015, 3(6): e01395-15.
- [9] Dong X, Bi D, Wang H, *et al.* *pirAB*(vp)-bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* pathogens isolated from the same AHPND-affected pond possess highly similar pathogenic plasmids[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1859.
- [10] Dong X, Wang H, Zou P, *et al.* Complete genome sequence of *Vibrio campbellii* strain 20130629003S01 isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis disease[J]. *Gut Pathog*, 2017, 9: 31.
- [11] Xiao J, Liu L, Ke Y, *et al.* Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by *pirAB*-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42177.
- [12] Han J E, Tang K T J, Aranguren L F, *et al.* Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, *pirAB*⁽⁻⁾ *V. parahaemolyticus*, and *pirAB*⁽⁺⁾ *V. campbellii* strains[J]. *Aquaculture*, 2017, 470: 84-90.
- [13] Fu S, Wang L, Tian H, *et al.* Pathogenicity and genomic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strain PB1937 causing shrimp acute hepatopancreatic necrosis

- disease in China[J]. *Annals of Microbiology*, 2018, 68: 175-184.
- [14] Fu S, Tian H, Wei D, *et al.* Delineating the origins of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from outbreaks of acute hepatopancreatic necrosis disease in Asia by the use of whole genome sequencing[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2354.
- [15] Theethakaew C, Nakamura S, Motooka D, *et al.* Plasmid dynamics in *Vibrio parahaemolyticus* strains related to shrimp acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS)[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2017, 51: 211-218.
- [16] Cowling D W, Gardner I A, Johnson W O. Comparison of methods for estimation of individual-level prevalence based on pooled samples[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 1999, 39(3): 211-225.
- [17] Anderson-Carpenter L L, McLachlan J S, Jackson S T, *et al.* Ancient DNA from lake sediments: bridging the gap between paleoecology and genetics[J]. *Bmc Evolutionary Biology*, 2011, 11: 30.
- [18] David J L. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics[J]. Chichester: Wiley, 1991: 115-175.
- [19] Vinoj G, Vaseeharan, B. , & Brennan, G. Green fluorescent protein visualization of *Vibrio parahaemolyticus* infections in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* (H Milne Edwards)[J]. *Aquaculture Research*, 2013, 45(12): 1989-1999.
- [20] Sirintip Dangtip R S, Piyachat S, Siripon T, *et al.* AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Aquaculture Reports*, 2015, 2: 158-162.
- [21] Yang Q, Dong X, Xie G, *et al.* Comparative genomic analysis unravels the transmission pattern and intra-species divergence of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2019, 294(4): 1007-1022.
- [22] Tran L, Nunan L, Redman R M, *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(1): 45-55.
- [23] Alikhan N F, Petty N K, Ben Zakour N L, *et al.* BLAST ring image generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 402.
- [24] Yingkajorn M, Mitraparp-Arthorn P, Nuanualsuwan S, *et al.* Prevalence and quantification of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during shrimp culture in Thailand[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 112(2): 103-111.
- [25] Chonsin K, Matsuda S, Theethakaew C, *et al.* Genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from farmed Pacific white shrimp and ambient pond water affected by acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Thailand[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(2): fnv222.
- [26] Noureen M, Tada I, Kawashima T, *et al.* Rearrangement analysis of multiple bacterial genomes[J]. *BMC Bioinformatics*, 2019, 20(Suppl 23): 631.

Conjugative plasmid diversity of *Vibrio parahaemolyticus* in the sediment of shrimp farm and its association with bacterial virulence

HAO Jingwei^{1,2}, HUA Xintong^{1,2}, FU Songzhe^{1,2*}, ZHOU Can^{1,2}, LIU Ying^{1,2}, HU Huizhi³

(1. College of Marine Technology and Environment, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Key Laboratory of Environment Controlled Aquaculture (KLECA),

Ministry of Education, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

3. College of Environment and Resources, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) caused by *Vibrio parahaemolyticus* is an emerging bacterial disease in cultured shrimp. The disease has caused the huge economic losses to the global shrimp aquaculture industry, with annual losses of over \$1 billion. All AHPND related *V. parahaemolyticus* contain a 70 kb plasmid with genes encoding homologues of the *Photobacterium* insect-related (Pir) binary toxin PirAB^{vp}, which is key virulence factor for shrimp. In order to clarify the genetic diversity of the conjugative plasmid of the *V. parahaemolyticus* strain that causes AHPND in the shrimp culture environment and understand the prevalence of AHPND-associated plasmid, this study was conducted in five coastal provinces in China. A total of 100 sediment samples were collected from the shrimp farms in the five coastal provinces. PCR was then conducted to amplify the *pirAB* and conserved genes encoding the conjugative transfer protein on the plasmids. *V. parahaemolyticus* strains were then isolated from the *pirAB*-positive sediment samples to obtain the plasmid. Sanger sequencing was then conducted to obtain the sequence of the plasmid. Finally comparative sequence analysis was performed to assess the plasmid diversity. The results showed that 39 out of 100 samples contained plasmid conjugative transfer protein fragments. 15 strains of *V. parahaemolyticus* were isolated from 100 sediment samples, 13 of which contained 1-2 plasmids. The results of plasmid sequencing showed that these plasmids can be divided into 8 types/profiles, of which 7 do not carry *pirAB* gene, but all contain gene clusters encoding conjugation transfer. According to the isolation of 8 types of plasmids carried by *V. parahaemolyticus*, 8 strains of *V. parahaemolyticus* were selected for prawn challenge experiments. It was found that the toxicity of these strains to prawns was significantly different, and the mortality rate of prawns was between 15%-100%. Only *pirAB* positive strains will produce AHPND symptoms, and the mortality rate of shrimp is 100%. The analysis of the plasmid composition shows that the genetic material exchange between plasmids is frequent, and the genetic composition of most of the plasmids comes from a 183 kb super-large plasmid pVP2HP. In this study, we found that the conjugative plasmids isolated from the sediments of shrimp farms had rich genetic diversity. Most of the plasmids are genetically composed of plasmid pVP2HP, and only *pirAB* positive strains will produce AHPND symptoms. This study improved understanding of plasmid genetic diversity of *V. parahaemolyticus* and its relationship with AHPND, and provided theoretical guidance for the prevention and control of AHPND.

Key words: shrimp; farming; acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND); *Vibrio parahaemolyticus*; plasmid diversity

Corresponding author: FU Songzhe. E-mail: fusongzhe@dlou.edu.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900500); Scientific Research Funding Project of the Education Department of Liaoning Province (QL202005); Key Research and Development Program of Guangdong Province (2019B020215001, GML2019ZD0402); National Natural Science Foundation of China (81903372)