

DOI: 10.11964/jfc.20230614036

鱼源无乳链球菌整合性接合元件 ICE_{Sag1535} 的生物信息特征, 剪切、环化活性与流行现状

车行¹, 卢燕播¹, 王承德², 罗敏意², 黎果³, 张德峰⁴, 林鑫¹, 赵丽娟^{1*}

1. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东 广州 510225; 2. 中山市小榄镇农业服务中心, 广东 中山 510230; 3. 高州市百联水产种苗有限公司, 广东 茂名 525200; 4. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380

摘要:

【目的】揭示水生动物源链球菌 ICEs 分子生物学特点、水平转移能力、ICEs 流行现状, 预测 ICEs 水平扩散的受体范围及对病原菌致病的影响。

【方法】在 NCBI 数据库中检索 ICEs 特征元件, 使用生物信息学方法对基因组进行分析, 并鉴定 ICE 的结构特征、主要元件功能, 利用分子生物学技术验证 ICE 在微生物间的水平转移能力并调查流行情况。

【结果】筛选出尼罗罗非鱼无乳链球菌 WC1535 基因组中存在一个完整的 ICE 位于 *mutT* 基因内, 命名为 ICE_{Sag1535_mutT} (简称 ICE_{Sag1535})。ICE_{Sag1535} 全长约 74.1 kb, 编码 73 个蛋白基因, 核心转移元件由 *Conj_{Tn5252}* 超家族的 25 个移动基因组成, 属于类 ICE_{Sa2603} 型 ICEs。ICE_{Sag1535} 核心区包含 5 个外源基因插入热点区 (HS), 可变区 (VR) 含有 7 个转座插入元件 (IS), 形成 3 个复合型转座子, HS 和 VR 可划分为 7 个主要功能区, 分别与 ICE 的稳定、接合偶联、物质跨膜运输、应激调控、细菌素合成与输出、接合拓展和宿主黏附等功能相关。ICE_{Sag1535} 的 3'-末端是同向串联的 3 个结构相似的位点特异性丝氨酸重组酶 (TSPSI), 对 TSPSI 进行聚类分析发现, 尼罗罗非鱼、美洲牛蛙和尖吻鲈分离菌株编码的 TSPSI 几乎完全相同, 都位于类 ICE_{Sa2603} 型 ICEs 内, 病原菌分布覆盖北半球水域。对不同来源 ICEs 同源性分析, 发现人、猪、鱼分离菌株携带的类 ICE_{Sa2603} 型 ICEs, 其接合模式皆为 *Conj_{Tn5252}* 型, 可跨种扩散。调查类 ICE_{Sa2603} 型 ICEs 的流行情况, 2014—2016 年分离的链球菌中携带比例为 78.8%, 而 2020—2021 年分离菌株的携带率为 96.3%, 呈上升趋势。验证 ICE_{Sag1535} 的水平转移能力, 检测到 ICE_{Sag1535} 从 WC1535 基因组自我剪切, 形成环化中间体, 然后插入在人链球菌 *Sag158* 基因组 *mutT* 内, 鉴定了转移过程中 *attL*、*attR*、*attB*、*oriT* 的位点特征; ICE 整合入 *Sag158* 后, 在 TSPSI 与 *attR* 位点之间检测到 IS30 插入元件。

【结论】本研究鉴定的 ICE_{Sag1535} 是具备自我切除和环化活性的完整 ICE, 可跨种扩散; 可变区多个复合转座子, 赋予 ICE 形成多重水平转移机制的能力, 增加流行多样性; 缘于 IS 的募集特性使 ICE 呈开放

第一作者: 车行, 从事水生动物病原微生物研究, E-mail: 767389937@qq.com



通信作者: 赵丽娟, 博士, 研究生导师, 从事水产健康养殖、病原微生物分子致病机理、微生物功能与肠道调控等领域研究, E-mail: zhaolijuan4234@163.com



资助项目: 2021 省级科技创新战略和乡村振兴战略专项 (2021S0082); 中山市 2022 年第二批社会公益与基础研究项目 (2022B2003); 广东省现代农业产业技术体系创新团队 (2019KJ141)

收稿日期: 2023-06-05

修回日期: 2023-11-01

文章编号:

1000-0615(2025)05-059114-11

中图分类号: Q 933; S 917.1

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)



式进化特点, 赋予宿主微生物不断增强的适应能力和扩散性致病能力。本研究内容对微生物安全、生物进化与遗传资源研究具有重要意义。

关键词: 尼罗罗非鱼; 无乳链球菌; ICE_Sag1535_mutT; Conj_{TnS252}; 三串联位点特异性丝氨酸重组酶; 水平基因转移; 跨种扩散; 开放式进化

原核生物以卓越的染色体可塑性而著称^[1], 通过水平基因转移 (HGT) 来高效获取遗传物质^[2-4]。微生物遗传物质的水平交流有多种方式, 接合转移 (conjugative transfer) 因打破交流双方种间亲缘壁垒和转移规模约束而成为遗传物质水平交流的主要方式, 对微生物进化、抗性元件扩散和病原菌跨宿主传播产生重要影响。根据接合过程的差异被分为质粒接合与整合性接合两种方式。ICEs 又称接合转座子, 通过供体与受体菌之间接合配对发生遗传物质转移进入受体, 并特异性整合入宿主染色体的特定位点, 实现在细菌间的接合转移^[5]。ICEs 包含一系列保守移动遗传元件 (MGEs) 组成的核心区以及位于核心区间的插入热点区和可变区。MGEs 是基因水平转移的基础元件, 通常包含三大功能模块, 分别为接合用装置模块 (transferosome)、偶联接合模块 (CPs) 和松弛整合模块 (relaxosome), 它们与 ICEs 切除、自我转移和受体菌配对、插入整合等功能相关, 而位于 HS 和 VR 的基因则赋予 ICEs 独特的功能^[6]。

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 又称 B 族链球菌 (GBS), 是侵入感染人类新生儿的首个病原菌^[7], 也是典型的人-畜-鱼多宿主共患病原^[8]。罗非鱼是我国重要的水产养殖优良品种, 产量居世界首位, 无乳链球菌已成为近年来罗非鱼养殖中最主要的细菌性致病菌。ICEs 在链球菌属被广泛报道, 但迄今为止, 未有水生动物源链球菌中发现 ICEs 的报道, 本研究从尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 源无乳链球菌 (WC1535 菌株) 基因组 (GCA_001729925.2) 中鉴定出一个完整的 ICE 元件, 从比较基因组学角度对该元件的生物信息学特征、att 位点、重组结构和同源性进行了分析, 调查了流行现状, 并验证了 ICE 的自我转移能力。

1 材料与方法

1.1 基因组学分析

通过搜索 NCBI 数据库中收集的水生动物

源链球菌基因组 121 株, 检索 ICEs 特征元件, 包括不同类型的 relaxases、coupling proteins、conjugal transfer proteins 和位点特异性重组酶, 在所得结果中逐层筛选, 分析基因组成、移动元件结构、重复序列等特征, 在尼罗罗非鱼无乳链球菌 WC1535 染色体上获得一个完整 ICE, 利用线上注释工具 RAST (rapid annotations using subsystem technology) 对目标片段所包含的 ORFs 序列进行识别和注释并进行注释结果分析。对 ICEs 中的保守基因和假定基因进行了保守结构域查找 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 以补充完善基因的功能。利用在线分析软件 (<https://www.novopro.cn/tools/repeats-finder.html>) 分析重复序列, 确认 att 位点和 oriT (origin of transfer)^[9]。

1.2 罗非鱼源无乳链球菌中 ICE_Sag1535 的检测

选择广东省 16 个县区水产养殖场分离的无乳链球菌 87 株, 检测对类 ICE_Sag1535 的携带情况。其中 33 株收集于 2014—2016 年, 54 株收集于 2020—2021 年, 以 ICE_Sag1535 核心元件基因 traC、virD4、relax1535 和 relaxosome 的保守区为模板设计引物, 当 4 个检测对象 PCR 结果全部为阳性时, 判断为具有 ICE_Sag1535 核心元件, 而 Ser_{IME}、Ser_I、Ser_M、Ser_E 分别检测重组酶的组成情况, 引物见表 1。

1.3 ICE_Sag1535 水平转移验证

罗非鱼源无乳链球菌 WC1535 菌株由中国水产科学研究院珠江水产研究所保存^[10], 人源无乳链球菌 Sag158 (GCA_002025005.1) 由上海交通大学医学院的孙景勇老师馈赠。接合转移方法参考已有文献^[11]并稍加修改。以 WC1535 作为供体菌, Sag158 为受体菌 (LEV^R), 各取 1 mL 均匀混合, 转入含 0.5 mL 罗非鱼血清的 12 孔细胞培养孔内, 加入一块 0.5 cm³ 的新鲜罗非鱼肝脏, 30 °C 静置培养 4 h。培养期间用引物 SerE-F2 和 repA-R 检测 ICE 可能存在的环状中间体, 选择 PCR 阳性者测序 (表 1)。取 200 μL

表 1 引物列表

Tab. 1 Principal oligonucleotide primers used in this study

目的基因 gene target	引物 primer	序列 sequence (5'-3')	产物长度/bp product size
<i>attICE</i>	SerE-F2 repA-R	CGTTGTGAACACTGTGACCATT GCGTAAGCTACCTTGACCTCTA	1 043
<i>cpsL</i>	cpsL-F cpsL-R	CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT TAGGAACATGTTCATTAACATAGC	688
<i>cpsG-3</i>	cpsG-F cpsG3-R	ACATGAACAGCAGTTCAACCGT TCCATCTACATCTTCAATCCAAGC	352
<i>cpsG</i>	cpsG-R	ATGCTCTCCAACTGTTCTTGT	272
<i>attL</i>	gtfB-F repA-R	AGCTCTACTCAGTATCAATCTG GCGTAAGCTACCTTGACCTCTA	895
<i>attR</i>	SerE-F2 nudiX-R	CGTTGTGAACACTGTGACCATT GTACCAATGCTTCATACCAACT	2 219
<i>traC</i>	traC-F traC-R	GTTGCAGGGTCTAATGACATGA TCAGACGCATATTTGTCCAAT	917
<i>virD4</i>	virD4-F virD4-R	TTGGATTTCGGTGATTGCGGTC TGAGAGGTAGAACTTGAGCC	554
<i>relax1535</i>	relA-F relA-R	GAACTCAAGCAGCGGCTCTA CTATTCGAGACCTACTTCGC	1 307
<i>relaxosome</i>	relM-F relM-R	TGTGTTTCAGGAGCTGATGGC GAAGACAAGCTGACACCAGA	727
<i>Ser_{IME}</i>	3SER-F 3SER-R	TAGTCGTCATGCGATGAAGC CATGCTGTTTCATCGCACTCT	2 589
<i>Ser_I</i>	SerI-F SerI-R	TCCATCATCAACCAACGCTCG GCTGGATTGACAGCTACAG	757
<i>Ser_M</i>	SerM-F SerM-R	TGAGATGGGACGACTGATTG TGCTCAGCTTGTAAGTACAG	980
<i>Ser_E</i>	SerE-F1 SerE-R	ATCATTGATGAGGCAGTTGC TGGTCACAGTGTTTCAACACG	466
IS30	rpL-F MFS-R	AAGTGCTGGTCCAACCTGGTG CTAGGTGGTGCAATTGGTGT	479

混合培养液均匀涂布于左氧氟沙星 (8 mg/L) 抗性平板上, 筛选对 LEV 耐药的阳性接合子, PCR 检测血清型和 ICE 核心元件。ICE 两侧的附着位点 *attL*、*attR* 分别用引物 gtfB-F 和 repA-R、SerE-F2 和 nudiX-R 检测, 选择 PCR 阳性测序。

2 结果

2.1 *ICESag1535* 基本结构

经生物信息学分析和判断, *ICESag1535* 位于 WC1535 基因组位置 (305 577~379 694 bp) 处, 全长 74 118 bp, 包含 73 个蛋白编码基因, GC 含量为 38%, 区别于基因组其他位置的 36%。ICE 接合转移核心元件由 Conj_{Tn5252} 家族保守接合元件组成 (图 1, 黑色箭头形成的主干)^[12], 约 26.1 kb, 占 ICE 全长的 37.3 %。ICE 的 3'-末端为 3 个同向串联的丝氨酸整合酶, 按照阅读顺序标记为 (Ser_I、Ser_M、Ser_E)。核心区存在 5 个外源 DNA 频繁插入的热点区域, 标记为 HS I ~

HS V。可变区总长约 32.5 kb, 含有 7 个 IS (图 1 灰色箭头), 形成 3 个复合型转座子。非核心区可被划分为 7 个功能集中区, 包括位于热点区的 D I ~D III 和位于可变区的 D IV ~D VII (图 1)。

2.2 ICE 插入位点

ICEs 常存在于染色体上的特定基因内^[13], 可能与 ICE 所携带的整合元件对这些高度保守的特定基因的特殊结构识别相关。在整合重组过程中, 松弛体在 *oriT* 处切开, 并牵引 DNA 在偶联蛋白的作用下发生水平转移, 受体基因组上与 ICEs 发生配对识别的位点称为 *attB*, ICEs 插入受体基因组时两侧的附着位点分别为 *attL* 和 *attR*^[14], 当 *ICESag1535* 整合入 WC1535 基因组时推定的 *attICE*、*attL*、*attR* 序列特征如图 2 中标记, 其中 *attR* 与 *attICE* 之间形成单碱基 (G) 重复。*oriT* 位于 Tn5252 orf10 基因起始密码子的上游 -95~133 bp 位置, 具有反向重复结构, 序列切开位置见图 2 中箭头所示。

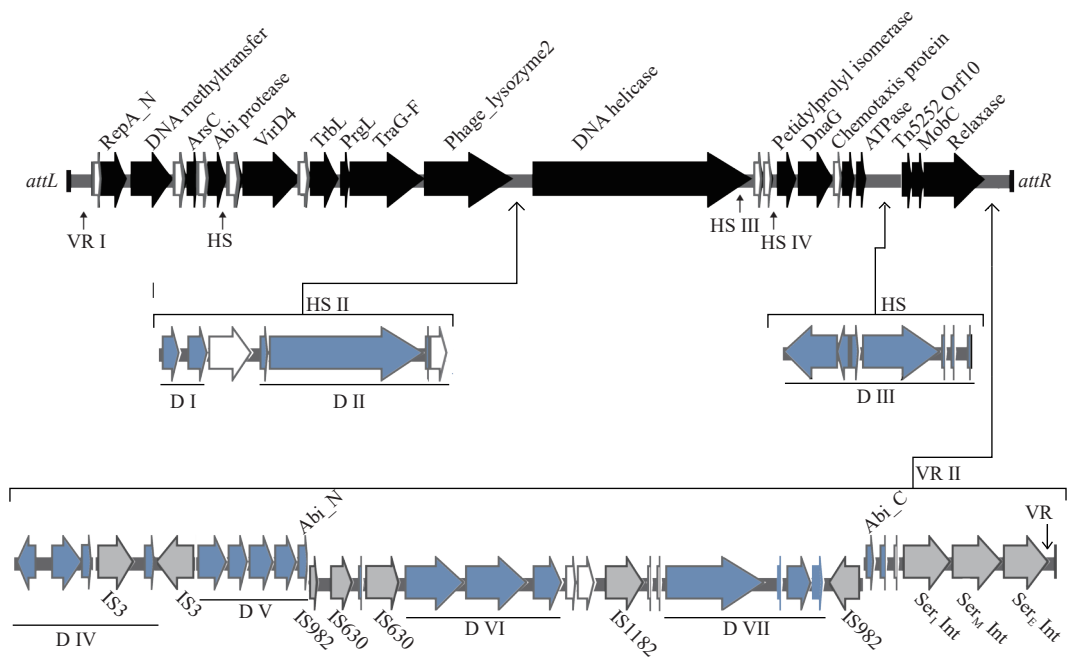


图 1 ICESag1535 结构示意图

黑色箭头代表 $Conj_{Tn5252}$ 家族的 25 个保守核心基因, 灰色箭头表示转座酶或整合酶, 空白箭头表示未知蛋白, ICESag1535 两侧的竖线代表 ICE 的始端 ($attL$) 和末端 ($attR$), HS 和 VR 表示可变基因的插入位置。

Fig. 1 Schematic representation of ICESag1535

The black arrows represent 25 conserved core genes of $Conj_{Tn5252}$ family, the gray arrows indicate transposases or integrases, the blank arrows mean unknown proteins, the short vertical lines at both sides of ICE_Sag1535_mutT elements represent the start ($attL$) and the end ($attR$) of them, HS and VR indicate the insertion positions of the variable regions.

2.3 ICESag1535 核心接合元件

ICESag1535 转移核心元件与最早从肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*) 鉴定的接合转座子 Tn5252 的保守核心移动元件同源^[15]。其中与配对和自我转移相关的核心元件由 IV 型分泌系统 (T4SS) 的同源蛋白组成, 分别为 (phage lysozyme、PrgI、TraC 和类 TrbL) 的同源蛋白 (图 1), 它们的功能与根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) Ti 质粒编码的 T4SS 蛋白 (VirB₁、VirB₃、VirB₄ 和 VirB₆) 功能相似^[16], 形成跨膜转移复合体并协助完成转移; 偶联接合蛋白为 VirD₄; 松弛模块由松弛酶 Relaxase、松弛动员蛋白 MobC 和松弛辅助蛋白 Tn5252 Orf10 组成, 在 *oriT* 位点形成切口并牵引 ICE 发生转移^[17]。

ICE 核心元件中含有 8 个未知功能蛋白, 此外, 还包括 DNA 解旋酶、复制相关蛋白 RepA、DNA 甲基化修饰蛋白 Dcm、转录调控相关蛋白 ArsC 和肽基脯氨酰异构酶、自免疫相关的 Abi 蛋白酶、DNA 拓扑异构酶 DnaG、细胞分裂趋化蛋白及 ATPase 蛋白, 以上 25 个功

能蛋白构成 ICESag1535 核心转移元件 (图 1 黑色箭头)。

2.4 可变基因

分析 ICESag1535 的非核心区功能, 发现 D I~D III 主要与 ICE 的稳定、核心元件的转录调节及应激保护相关, 而可变区主要协助宿主菌环境适应和提供功能拓展。HS II 编码一对 AbiEii/AbiGii 毒素-抗毒素蛋白 (图 1 中 D I), 用于维持 ICE 稳定, 防止脱落^[18]。D II 区推测与 ICE 转移时供体菌与受体菌的配对和位置调节相关^[19]。D III 区参与氧化还原与应激调节^[20]。可变区主要参与细菌素合成输出 (D IV)、物质跨膜运输与调控 (D V), 及宿主致病相关 (D VII)。位于可变区的 D VI 区集中了 3 个 T4SS 同源蛋白, 根据蛋白结构推测具有增强细胞壁溶解, 形成跨膜通道, 增加 ICE 接合输出, 参与感染和免疫逃避等功能相关 (表 2)。

2.5 转座元件和重组酶结构分析

位于 ICESag1535 的 3'-末端的 TSPSI 结构

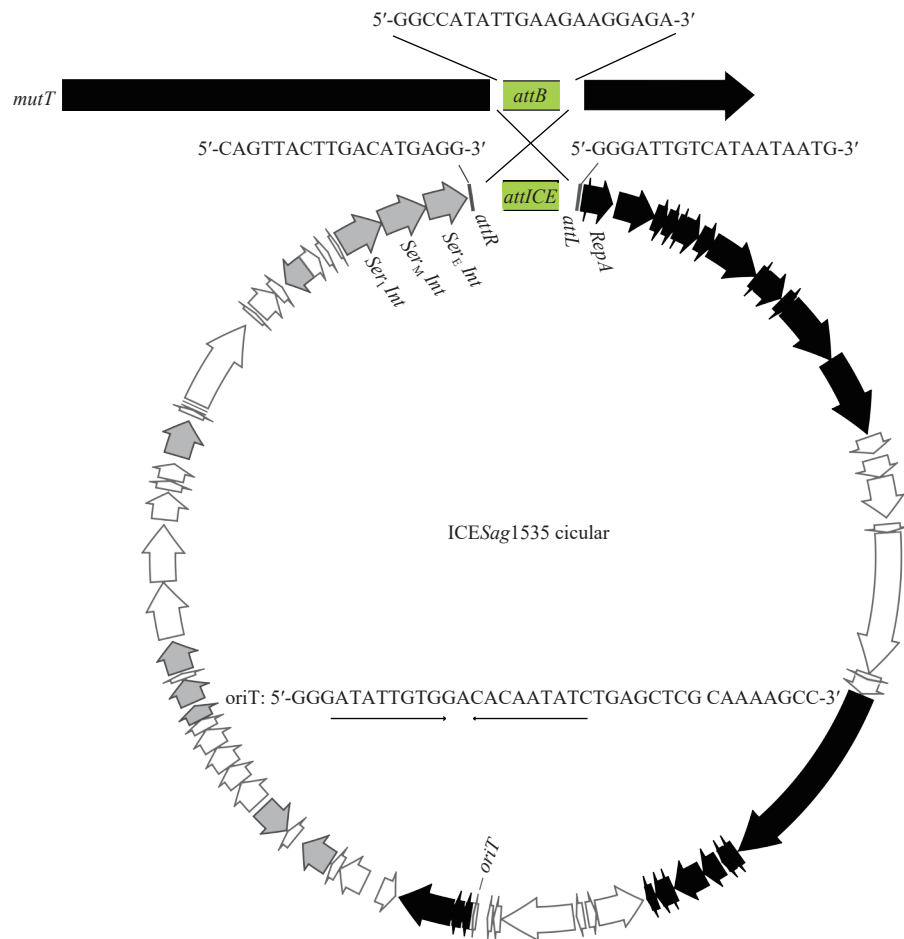


图 2 *attL*、*attR*、*oriT* 与 ICESag1535 在基因组上的识别位点 *attB*

attB、*attICE*、*attL*、*attR* 位点和推测的 *att* 序列标注于图中；*oriT* 位点如图所示，序列下方的箭头表示反向重复的位置，垂直的箭头表示切开缺口的位置。

Fig. 2 The recognition site *attB* of *attL*, *attR*, *oriT* and ICESag1535

The *attB*, *attICE*, *attL*, *attR* sites and the putative *att* sequence were indicated, the *oriT* site as shown as in the Fig, arrows under the sequence represent the locations of inverted repeats, and the vertical arrows show the nick sites.

中都含有典型的 SR_TndX_transposase domain (图 3)，此模块兼具解离酶 (resolvas)、转化酶 (invertase)、整合酶 (integrase) 和转座酶 (transposase) 功能，并调节 DNA 切除和环化，辅助松弛蛋白的功能^[21]。Recombinase domain 在微生物和噬菌体中常与 resolvase domain 联合出现，形成催化活性位点^[22]。Zn_ribbon_recom domain 在位点特异性重组酶中为简化的 Zn-binding 结构域，激活转录蛋白活性^[23]。以 ICESag1535 编码的 TSPSI 为质询序列，通过 Blast 搜索 NCBI 数据库，发现有 8 个水生动物源无乳链球菌菌株存在与 ICESag1535 相似的未鉴定 ICE 序列，分布位置跨北美洲到亚洲，细菌宿主包含美洲牛蛙 (*Lithobates catesbeiana*)、尖吻鲈 (*Lates cal-*

carifer) 和尼罗罗非鱼，它们编码的 TSPSI 几乎完全相同 (图 4)，插入位点全部为 *mutT* 基因，表明本研究中发现的类 ICESag1535 已在全球范围分布。

两个相同类型的 IS 可组成复合型转座子，对夹在其间的 DNA 进行转座^[24]。ICESag1535 可变区包含 7 个 IS 元件，形成 3 个复合型转座子 (图 1)，分别为 2 个对向排列的 IS3 中间夹着的细菌素转运酶插入在基因间隔区，2 个对向排列的 IS982 连同中间夹着的多个基因插入在 *Abi* 基因内，2 个同向排列的 IS630 夹着核苷酸转移酶插入在 IS982 复合转座子内。分析 IS 的结构发现，每个 IS3 和每个 IS630 皆具有转座对应的复合转座子能力，IS3 和 IS630 由 2 个

表 2 可变区主要蛋白及功能
Tab. 2 Function of proteins in variable regions

功能分区 functional area	蛋白描述 proteins description	主要功能 function
D I	AbiEii/ AbiGii 毒性蛋白家族	维持 ICE 稳定, 防止脱落
D II	凝集素受体 LPXTG 锚定蛋白 滑动调节脂蛋白CglD	黏附、识别和位置调节等
DIII	FAD依赖性氧化还原酶 类rhodanese主要结构域蛋白 金属敏感性转录调节因子 依赖性氧化还原酶	参与氧化还原与应激调节
DIV	AcrR家族转录调节蛋白 ThiF家族腺苷转移酶 羊毛硫细菌素转座透性酶 羊毛硫细菌素转座透性酶	微生物素 C7 生成转录与转运
DV	ABC转运ATP绑定蛋白 ABC转运透性酶 ABC转运ATP绑定蛋白 ATP绑定蛋白 CAAX 氨基酸蛋白酶, Abi	ABC 物质运输与代谢
DVI	AAA-10 ATP绑定蛋白 接合转移蛋白TrbL 噬菌体溶菌酶	T4SS 同源蛋白, 分别与VirB ₄ 、VirB ₆ 和 VirB ₁ 同源
DVII	Cna B型胶原绑定蛋白 ABC绑定蛋白 ABC_DR蛋白 ABC转运透性酶	细菌黏附和物质转运

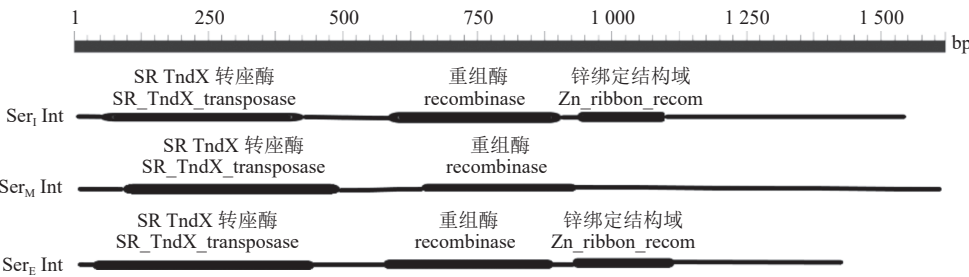


图 3 三串联丝氨酸整合酶结构

Fig. 3 The conserve domains distribution in the triplet of site-specific serine recombinases

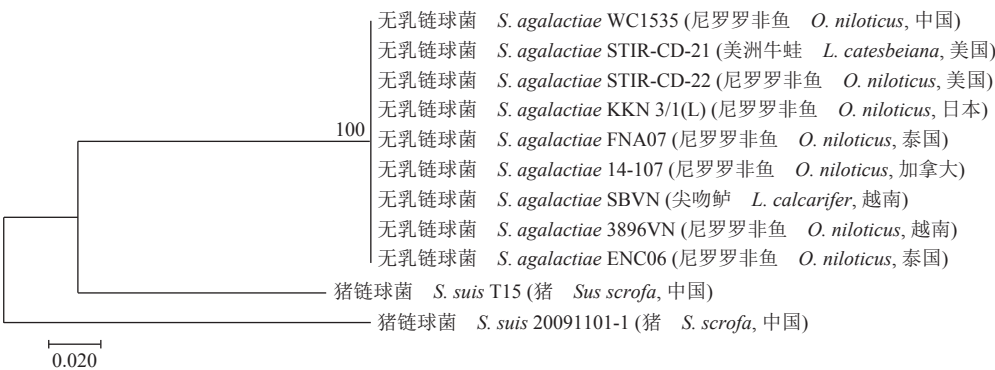


图 4 三串联丝氨酸整合酶的系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of the triplet of site-specific serine integrases

ORF 模块 (ORFA 和 ORFB) 组成, ORFB 编码位置相对 ORFA 分别具有 (-1 bp) 和 (+1 bp) 的移码特征, 当转座被激活时, ORFB 发生程序化移码, 使 ORFA 和 ORFB 处于同一阅读框中, 形成融合蛋白 ORFAB, 成为具有活力的转座酶^[25]。而 IS982 复合转座子中仅 3'端的 IS982 具有转座活力。此外, 7 个 IS 元件的 C-端皆具有 DDE 特征性基序, TSPSI 和多复合转座元件同时存在可介导 ICE 形成的多种水平转移机制。

2.6 ICESag1535 同源性比较

Tn5252 是链球菌属最早被鉴定的接合型转座子, 此后, 不同来源的 $\text{Conj}_{\text{Tn5252}}$ 型 ICEs 不断被报道^[26]。ICESa2603 家族 ICEs 以人无乳链球菌株 2603V/R 编码的 ICE_Sag2603_rplL 为代表, 具有 30 个骨架基因 (图 5, ICESa2603 中黑色、蓝色、灰色箭头所示)^[27], 属于 $\text{Conj}_{\text{Tn5252}}$ 型接合模式。ICE_SsuT15_mutT 来自猪链球菌 T15^[28], 缺失 AbiEii/AbiGii 蛋白, 与 ICESag1535 都编码三串联丝氨酸整合酶; 根据 ICEs 结构组成, ICESag1535 和 ICE_SsuT15_mutT 都鉴定为类 ICESa2603 型 ICEs^[29], 接合模式为 $\text{Conj}_{\text{Tn5252}}$ 型。这种接合模式的 ICEs 存在于多种微生物内, 且结构保守, 具有种间扩散能力。

2.7 ICESag1535 在罗非鱼无乳链球菌中的检测

87 株罗非鱼源无乳链球菌中, 具有

ICESag1535 核心元件的菌株共 78 株, 分别为 2014—2016 年收集的 26 株, 2020—2021 收集的 52 株, 核心元件的携带率分别为 78.8% 和 96.3%。在所有具有 ICEs 核心元件的菌株中, 同时检出 Ser_{IME} 、 Ser_I 、 Ser_M 和 Ser_E 的有 76 株, 2 株具有 ICE 核心元件的菌株未检出 Ser_{IME} , 可能使用其他类型的重组酶。

2.8 ICESag1535 水平转移验证

根据细菌表面荚膜多糖的不同, 无乳链球菌可分为不同的血清型。WC1535 为 Ia 血清型, *cpsG* 引物扩增产物为 272 bp, 而 Sag158 为 III 型血清型, *cpsG*-3 扩增产物为 352 bp。通过接合实验成功获得 ICESag1535 转入 Sag158 的接合子 Sag158::ICESag1535, 引物 *attICE* 检测到了环状中间体 (图 6)。

接合子中 ICESag1535 插入在受体菌 Sag158 基因组 *mutT* 基因内, 测序发现接合子 *attL* 和 *attICE* 位点与 WC1535 上完全相同, 但在 *attR* 的测序结果中发现 1 537 bp 的插入元件 IS30 位于 Ser_E 终止密码后 (+3 bp) 处, 并使插入位点前 14 bp 序列形成重复, 分别位于 IS30 两端 (图 6-f), 比对发现在 WC1535 和 Sag158 基因组上其他位置存在与 IS30 完全相同的拷贝。

3 讨论

类 ICESa2603 家族的 ICEs 被大量报道, 编码 $\text{Conj}_{\text{Tn5252}}$ 型接合元件, 可发生跨种扩散,

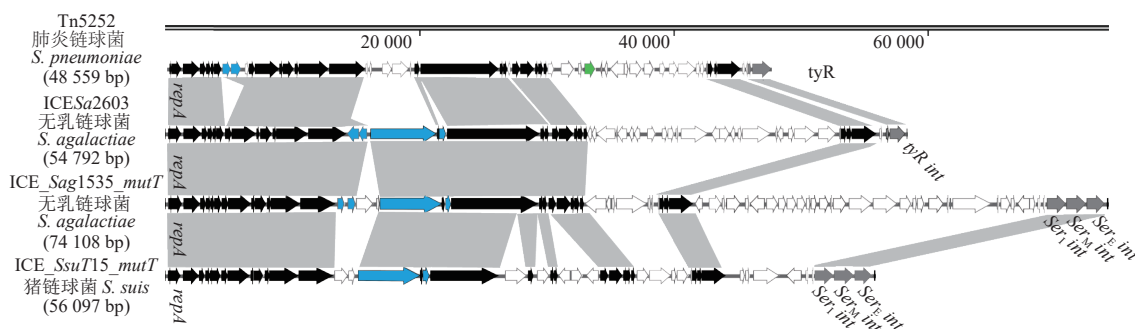


图 5 ICESag1535 比对示意图

比例示意图, ICESag1535 与无乳链球菌 ICESa2603、肺炎链球菌中 Tn5252、猪链球菌 T15 中的 ICE_SsuT15_mutT 线性比对。Conj_{Tn5252} 家族的 25 个保守核心基因用黑色箭头指示, 灰色箭头表示转座酶和整合酶, 绿色箭头表示抗性基因, 4 个 ICEs 之间的同源基因分别用蓝色箭头表示, 同源区域用灰色阴影表示。

Fig. 5 Schematic diagram of the ICESag1535 and linear DNA comparison

Schematic, but to scale, representation of ICESag1535 and linear DNA comparison against ICESa2603 from *S. agalactiae* 2603V/R and fragments of Tn5252 from *S. pneumoniae* and ICE_SsuT15_mutT from *S. suis* T15 strain. The 25 conserved core genes of the $\text{Conj}_{\text{Tn5252}}$ family are indicated by black and dark gray arrows, green arrow indicate antibiotic gene, blue arrows indicate homologous genes, homologous regions are shaded in gray.

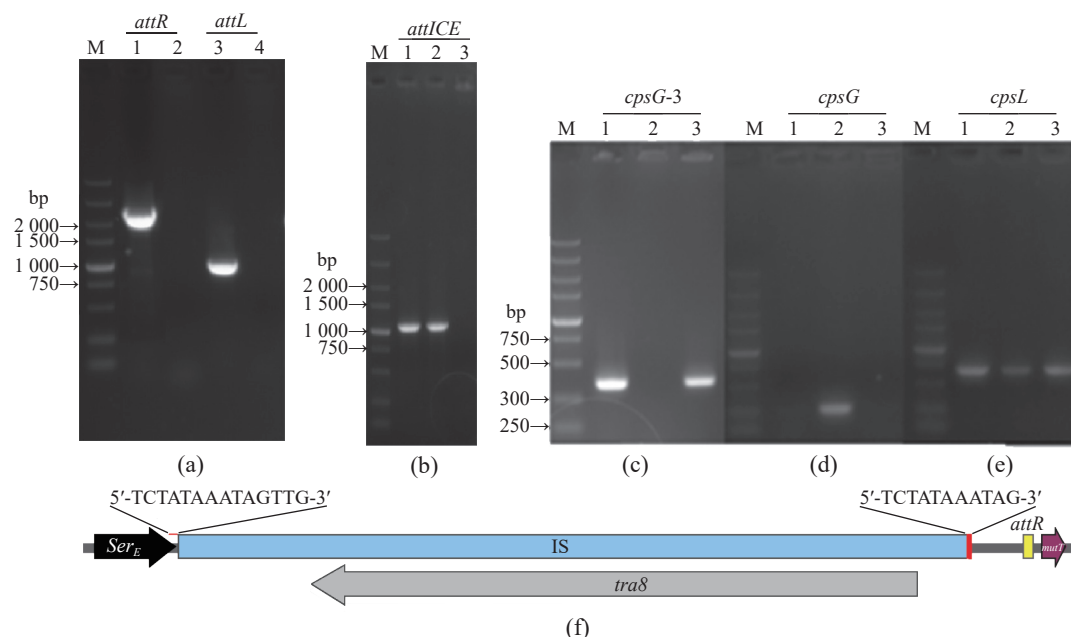


图6 接合检测

(a) 附着位点鉴定, 1、3.接合子, 2、4. Sag158, M. DNA Marker。(b) ICE 环状体检测, 1、2.接合子, 3. Sag158。(c)~(e) 血清型检测, 1.接合子, 2. WC1535, 3. Sag158。(f) *attR* 端插入序列位置。黑色箭头为 *Ser_E*, 蓝色代表插入序列 IS。

Fig. 6 Confirmation of conjugant

(a) identification the integration site *attR* and *attL*, 1, 3. conjugant, 2, 4. Sag158. (b) detection of the covalent circular intermediate of ICE, 1, 2. conjugant, 3. Sag158. (c)~(e) identification serotype genes of *cpsG-3*, *cpsG* and *cpsL*, respectively, 1. conjugant, 2. WC1535, 3. Sag158. (f) the inserted sequence of *attR*. The black arrow is gene *Ser_E*, the blue rectangle representation of inserted sequence.

含单个重组酶的 ICEs 在转移时通常整合在固定的插入位点, 而 TSPSI 在跨种转移时可能产生新的插入位点^[30], 本实验检出的 76 株含 TSPSI 的 ICEs 菌株全部插入在 *mutT* 基因。

除了编码 TSPSI, ICESag1535 可变区携带多个转座元件, 转座元件具有跳跃和招募特性, 使可变区不断汇集新的功能基因。单个重组酶或复合转座子都具有借助接合系统介导 ICEs 发生水平转移的能力^[31], 因而形成多重 ICE 水平转移机制, 产生具有不同可变区的 ICEs, 增加流行多样性。此外, ICESag1535 核心元件中形成接合用装置的 T4SS 结构蛋白, 如 TraC、溶菌酶蛋白和 VirD4, 是 G⁺、G⁻ 通用的接合蛋白。可变区编码的 3 个接合相关蛋白 (图 1, DVI), 其中偶联蛋白 (AAA-10 binding protein) 与质粒 RP4 接合用 ATPase 同源, 补充了 TraC 的功能; 而与核心区同源的 TrbL、phage Lysozyme 不但可以扩展 ICE 核心元件接合转移范围, 使 ICE 具有更广泛的接合扩散性, 并且输出蛋白参与感染和免疫逃避等功能。

ICEs 与接合质粒虽然都可以介导遗传物质

的接合转移, 但 ICEs 通常稳定存在于基因组中, 当被激活后才发生转移^[32]。关于 ICEs 的文献报道中, 多强调其作为接合转移元件, 加速耐药基因的传播。图 5 中, 仅 Tn5252 携带有氯霉素抗性基因 (*cat*), 其余 ICEs 并不编码典型专用抗性元件, 因此, 类 ICESa2603 型 ICEs 的广泛传播并非单纯与耐药相关, 而与 ICEs 参与宿主感染和环境适应功能相关。ICESag1535 核心区编码的 DNA 甲基转移酶和肽基脯氨酰异构酶具有全局调控功能, 对宿主菌生长代谢、周期调控和宿主感染均产生重要作用^[33-34]。图 5 中, ICESag1535 相比其他 ICEs, 可变区聚集多个宿主感染相关蛋白, 如凝集素受体、黏附素蛋白、滑动蛋白 (CglD)、溶菌酶、胶原蛋白、Abi 蛋白酶等, 而且不断汇集新的功能基因, 呈开放式进化特点, 这些结构决定了 ICESag1535 相比其他 ICEs 具有更广泛的接合扩散性和协助细菌感染宿主的能力, 甚至产生跨宿主感染。

参考文献 (References):

- [1] Daubin V, Szollosi G J. Horizontal gene transfer and the his-

- tory of life[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016, 8(4): a018036.
- [2] Bellanger X, Payot S, Leblond-Bourget N, *et al.* Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(4): 720-760.
- [3] Weiss E, Spicher C, Haas R, *et al.* Excision and transfer of an integrating and conjugative element in a bacterial species with high recombination efficiency[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 8915.
- [4] Guédon G, Libante V, Coluzzi C, *et al.* The obscure world of integrative and mobilizable elements, highly widespread elements that pirate bacterial conjugative systems[J]. *Genes*, 2017, 8(11): 337.
- [5] Johnson C M, Grossman A D. Integrative and conjugative elements (ICEs): what they do and how they work[J]. *Annual Review of Genetics*, 2015, 49: 577-601.
- [6] Delavat F, Miyazaki R, Carraro N, *et al.* The hidden life of integrative and conjugative elements[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(4): 512-537.
- [7] Raabe V N, Shane A L. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*)[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(2): 10.
- [8] Evans J J, Bohnsack J F, Klesius P H, *et al.* Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, 57(Pt 11): 1369-1376.
- [9] Li X B, Xie Y Z, Liu M, *et al.* oriTfinder: a web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W229-W234.
- [10] Hao J W, Wang S Y, Yang J C, *et al.* Attenuated *Streptococcus agalactiae* WC1535 Δ Sia perturbs the gut microbiota of *Oreochromis niloticus*, massively colonizes the intestine, and induces intestinal mucosal immunity after intraperitoneal inoculation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1036432.
- [11] Zhou K X, Xie L Y, Han L Z, *et al.* ICE_{Sag37}, a novel integrative and conjugative element carrying antimicrobial resistance genes and potential virulence factors in *Streptococcus agalactiae*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1921.
- [12] Kiliç A O, Vijayakumar M N, Al-Khaldi S F. Identification and nucleotide sequence analysis of a transfer-related region in the streptococcal conjugative transposon Tn5252[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(16): 5145-5150.
- [13] Wozniak R A F, Waldor M K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(8): 552-563.
- [14] Thorpe H M, Wilson S E, Smith M C M. Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage ϕ C31[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(2): 232-241.
- [15] Srinivas P, Vijayakumar M N. Genetic and transcriptional analysis of a regulatory region in streptococcal conjugative transposon Tn5252[J]. *Plasmid*, 2000, 44(3): 262-274.
- [16] von Bodman S B, McCutchan J E, Farrand S K. Characterization of conjugal transfer functions of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58[J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(10): 5281-5289.
- [17] Srinivas P, Kiliç A O, Vijayakumar M N. Site-specific nicking *in vitro* at *oriT* by the DNA relaxase of Tn5252[J]. *Plasmid*, 1997, 37(1): 42-50.
- [18] Dy R L, Przybilski R, Semeijn K, *et al.* A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(7): 4590-4605.
- [19] Jakobczak B, Keilberg D, Wuichet K, *et al.* Contact- and protein transfer-dependent stimulation of assembly of the gliding motility machinery in *Myxococcus xanthus*[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(7): e1005341.
- [20] Boylan J A, Hummel C S, Benoit S, *et al.* *Borrelia burgdorferi* bb0728 encodes a coenzyme A disulphide reductase whose function suggests a role in intracellular redox and the oxidative stress response[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(2): 475-486.
- [21] Wang H M, Mullany P. The large resolvase TndX is required and sufficient for integration and excision of derivatives of the novel conjugative transposon Tn5397[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(23): 6577-6583.
- [22] Van Duyne G D, Rutherford K. Large serine recombinase domain structure and attachment site binding[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 48(5): 476-491.
- [23] Keenholtz R A, Rowland S J, Boocock M R, *et al.* Structural basis for catalytic activation of a serine recombinase[J]. *Structure*, 2011, 19(6): 799-809.

- [24] Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 725-774.
- [25] Sekine Y, Izumi K I, Mizuno T, *et al.* Inhibition of transpositional recombination by OrfA and OrfB proteins encoded by insertion sequence IS3[J]. *Genes to Cells*, 1997, 2(9): 547-557.
- [26] Brochet M, Couvé E, Glaser P, *et al.* Integrative conjugative elements and related elements are major contributors to the genome diversity of *Streptococcus agalactiae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(20): 6913-6917.
- [27] Huang J H, Liang Y, Guo D W, *et al.* Comparative genomic analysis of the ICESa2603 family ICEs and spread of *erm*(B)- and *tet*(O)-carrying transferable 89K-subtype ICEs in swine and bovine isolates in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 55.
- [28] Yi S D, Huang J H, Hu X, *et al.* Nonconservative integration and diversity of a new family of integrative and conjugative elements associated with antibiotic resistance in zoonotic pathogen *Streptococcus Suis*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 254: 109009.
- [29] Puymège A, Bertin S, Guédon G, *et al.* Analysis of *Streptococcus agalactiae* pan-genome for prevalence, diversity and functionality of integrative and conjugative or mobilizable elements integrated in the tRNA^{Lys} CTT gene[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2015, 290(5): 1727-1740.
- [30] Ambroset C, Coluzzi C, Guédon G, *et al.* New insights into the classification and integration specificity of *Streptococcus* integrative conjugative elements through extensive genome exploration[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 6: 1483.
- [31] Yang Q, Zhu Y, Schwarz S, *et al.* Integrative and conjugative elements in streptococci can act as vectors for plasmids and translocatable units integrated via IS1216E[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2023, 61(5): 106793.
- [32] McKeithen-Mead S A, Grossman A D. Timing of integration into the chromosome is critical for the fitness of an integrative and conjugative element and its bacterial host[J]. *PLoS Genetics*, 2023, 19(2): e1010524.
- [33] Bujnicki J M. Sequence permutations in the molecular evolution of DNA methyltransferases[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2002, 2: 3.
- [34] Galat A. Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity-targets-functions[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2003, 3(12): 1315-1347.

Bioinformatic characteristics, excision/cyclization activities and prevalence of an ICE element, ICESag1535, in *Streptococcus agalactiae* isolated from fish

CHE Hang¹, LU Yanbo¹, WANG Chengde², LUO Minyi², LI Guo³,
ZHANG Defeng⁴, LIN Li¹, ZHAO Lijuan^{1*}

1. College of Animal Science and Technology,

Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. Agricultural Service Center of Xiaolan Town, Zhongshan 510230, China;

3. Bailian Aquatic Seedling Co., Ltd. of Gaozhou City, Maoming 525200, China;

4. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China

Abstract: With the exponential expansion of sequenced complete streptococcal genomes, numerous integrative and conjugative elements (ICEs) have been identified. However, the characteristics of ICEs in *Streptococci* spp. of aquatic animal origin remain enigmatic. This study aims to analyze the bioinformatic characteristics of ICEs originating from aquatic animals, verify their horizontal transfer capabilities, investigate the prevalence in bacteria, predict their microbial host distribution for horizontal diffusion, and detect their contributions to pathogenicity of host bacteria. Integrated genomic approaches were employed to systematically characterize the structural-functional attributes and epidemiological distribution of ICEs, complemented by *in vitro* functional assays to validate their horizontal gene transfer capacity and molecular mechanisms. A complete ICE element

was identified in strain WC1535 isolated from *Oreochromis niloticus*, named ICE_Sag1535_mutT (abbreviation as ICESag1535). The bioinformatic characteristics of ICEs were analyzed, including their conjugation modules, recombinase composition, variable region function, and ICE homology. ICESag1535 belongs to the ICESa2603 family-like ICEs, with a length of approximately 74.1 kb, encoding 73 genes. It contains 25 core mobile genes of the Conj_{Tn5252} superfamily that form the backbone of conjugant modules. The conserved backbone region of ICESag1535 includes 5 foreign gene insertion hotspots (HS), and a variable region (VR) containing 7 transposable insertion elements (IS), forming 3 complex transposons. These HS and VR can be divided into 7 major functional regions involved in the ICE functions, such as regulation of ICE stability, conjugation coupling, material transmembrane transportation, stress regulation, bacteriocin synthesis and export, integrative and conjugative evolution, host adhesion. Additionally, the 3'-terminal of ICESag1535 consists of three structurally similar tandem site-specific serine integrases (TSPSI). Cluster analysis of TSPSI revealed that *S. agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus*, *Lithobates catesbeiana* and *Lates calcarifer* share identical TSPSIs within ICESa2603-like ICEs distributed in the Northern hemisphere aquatic ecosystem. Homology analysis of ICEs indicated that the conserved conjugational transfer backbone of ICESa2603-like ICEs, encoded by human, pig, and fish isolates, is homologous to Conj_{Tn5252} conjugant modules and has the ability to spread across species. The prevalence of ICESa2603-like ICEs in *S. agalactiae* from *Oreochromis niloticus* in Guangdong province was detected by PCR. The rate of ICE-carrying bacteria increased from 78.8% in isolates from 2014 to 2016 to 96.3% isolated from 2020 to 2021, indicating an upward trend. Conjugation experiments verified that ICE Sag1535 can excise itself from the genome, cyclize, self-transfer, and inserted into the recipient bacterium, Sag158. The *attL*, *attR*, *attB*, and *oriT* sites were characterized. After ICE integration into Sag158, the IS30 element was detected between the TSPSI and *attR* sites. ICESag1535, identified in this study, is a complete ICE element with self-excision and cyclization activities and cross-species conjugal transfer capability. The variable region contains a variety of complex transposons, leading to the formation of multiple horizontal transfer mechanisms and increasing prevalence diversity. Due to the recruitment specialty of IS elements, the variable region of ICEs exhibits open-ended evolution, conferring the host microbe with increased potential for pathogenicity and dissemination. This research holds significant implications for microbial safety, biological evolution, and genetic resources research.

Key words: *Oreochromis niloticus*; *Streptococcus agalactiae*; ICE_Sag1535_mutT; Conj_{Tn5252} conjugation modules; triplet of site-specific serine integrases; horizontal genes transfer; spread across species; open-ended evolution

Corresponding author: ZHAO Lijuan. E-mail: zhaolijuan4234@163.com

Funding projects: Guangdong Provincial Special Fund For Science and Technology Innovation Strategy and Rural Revitalization Strategy in 2021 (2021S0082); the Second Batch of Social Welfare and Basic Research Fund of Zhongshan in 2022 (2022B2003); Guangdong Provincial Special Fund for Modern Agriculture Industry Technology Innovation Teams (2019KJ141)