

信号分子 AI-2 对副溶血性弧菌四环素耐药基因接合转移的影响

王 婷^{1,2}, 林才云^{1,2}, 姚 琳², 王联珠², 曲 梦², 李风铃²,
谭志军^{2,3}, 江艳华^{2*}, 王 鹏^{1*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 青岛 266033)

摘要: **目的** 探讨信号分子 AI-2 对海产品中分离的副溶血性弧菌四环素耐药基因接合转移的影响作用。**方法** 分别构建经 AI-2 处理和未经 AI-2 处理的副溶血性弧菌和大肠埃希氏菌的接合反应体系, 通过菌落计数法测定不同浓度 AI-2 对副溶血性弧菌四环素耐药基因接合频率的影响, 采用逆转录实时荧光定量聚合酶链式反应法测定不同浓度 AI-2 对接合转移调控相关基因转录水平的影响。**结果** 副溶血性弧菌 Vp2015094 和 Vp2016058 的四环素耐药基因可以通过接合作用转移至大肠埃希氏菌 K12 中, 15、30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 AI-2 能显著提高 Vp2015094 的接合频率($P<0.05$), 6、15、30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 AI-2 能极显著提高 Vp2016058 的接合频率($P<0.01$), 30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 AI-2 能显著提高 Vp2015094 的接合转移调控相关基因 *traF* 的转录水平以及 Vp2016058 的接合调控相关基因 *traF*、*trbB* 的转录水平($P<0.05$)。**结论** AI-2 能增强副溶血性弧菌四环素耐药基因的接合转移, 表明 AI-2 能促进细菌耐药基因的扩散, 为建立基于群体感应的细菌耐药性控制技术奠定基础。

关键词: 副溶血性弧菌; 信号分子 AI-2; 四环素耐药基因; 接合转移

Effects of signaling molecule AI-2 on conjugation transfer of tetracycline resistance genes in *Vibrio parahaemolyticus*

WANG Ting^{1,2}, LIN Cai-Yun^{1,2}, YAO Lin², WANG Lian-Zhu², QU Meng²,
LI Feng-Ling², TAN Zhi-Jun^{2,3}, JIANG Yan-Hua^{2*}, WANG Peng^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266033, China)

基金项目: 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022020004)、国家自然科学基金项目(31601566)、青岛市工程研究中心专项资金项目

Fund: Supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022020004), the National Natural Science Foundation of China (31601566), and the Special Fund of Engineering Research Center of Qingdao

*通信作者: 江艳华, 高级工程师, 主要研究方向为水产品中生物危害物检测与控制。E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn

王 鹏, 教授, 主要研究方向为海洋微生物。E-mail: pengwang@ouc.edu.cn

*Corresponding author: JIANG Yan-Hua, Senior Engineer, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, No.106, Nanjing Road, Qingdao 266071, China. E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn

WANG Peng, Professor, Ocean University of China, No.5, Yushan Road, Qingdao 266003, China. E-mail: pengwang@ouc.edu.cn

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of signaling molecule AI-2 on conjugation transfer of tetracycline resistance genes in *Vibrio parahaemolyticus* strains from seafoods. **Methods** The conjugation reaction systems for *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli* treated and untreated by AI-2 were constructed, the effects of AI-2 at different concentrations on conjugation frequency of tetracycline resistance genes in *Vibrio parahaemolyticus* were determined by colony counting method, the effects of AI-2 at different concentrations on the transcriptional levels of conjugation transfer related genes of *Vibrio parahaemolyticus* were assayed by reverse transcription and real-time quantitative polymerase chain reaction. **Results** The tetracycline resistance genes in *Vibrio parahaemolyticus* Vp2015094 and Vp2016058 could transfer into *Escherichia coli* K12, AI-2 at the concentrations of 15 and 30 $\mu\text{mol/L}$ could significantly increase the conjugation frequency of Vp2015094 ($P<0.05$), AI-2 at concentrations of 6, 15 and 30 $\mu\text{mol/L}$ could increase the conjugation frequency of Vp2016058 very significantly ($P<0.01$), 30 $\mu\text{mol/L}$ AI-2 could significantly increase the transcriptional levels of conjugation transfer regulated genes *traF* in Vp2015094 and both *traF* and *trbB* in Vp2016058 ($P<0.05$). **Conclusion** AI-2 can enhance the conjugation transfer of tetracycline resistance genes in *Vibrio parahaemolyticus*, which indicates that AI-2 can accelerate the dissemination of antibiotic resistance genes. These results provide a basis for developing control techniques of antibiotic resistance based on quorum sensing.

KEY WORDS: *Vibrio parahaemolyticus*; signaling molecule AI-2; tetracycline resistance genes; conjugation transfer

0 引言

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性嗜盐菌,广泛分布于海洋环境和海产品中,人类感染该菌会患急性肠胃炎,表现为腹泻、腹痛及呕吐等症状,严重者出现败血症^[1]。副溶血性弧菌已成为全球最重要的食源性致病菌之一,是我国引起食源性疾病的最主要微生物病原^[2-3]。抗菌药的广泛使用导致细菌耐药性日益严重,导致临床用药失效,严重威胁人类健康。通过多年的监测发现,作为海产品中最主要的食源性致病菌——副溶血性弧菌也存在一定程度的耐药性^[4-5],影响着海产品的质量安全。

细菌耐药性的产生机制包括固有性耐药和获得性耐药,其中获得性耐药占主要,耐药基因的水平转移是获得性耐药的主要原因^[6]。由于很多耐药基因位于质粒上,因此质粒的接合转移是耐药基因扩散的最主要方式^[7-8]。接合质粒能够自发进行接合反应,这不仅与接合转移相关基因有关,还与细菌中的其他调控系统相关,其中就包括群体感应(quorum sensing)系统^[9]。群体感应是细菌间交流的一种现象,通过分泌的信号分子调控自身行为及生理过程^[10]。群体感应信号分子主要包括革兰氏阳性细菌中的自诱导肽类(autoinducing peptide, AIP)、革兰氏阴性细菌中的酰基高丝氨酸内酯类(acyl-homoserine lactones, AHLs)及革兰氏阳性细菌与阴性细菌中都存在的自诱导 II 类分子(autoinducer-2, AI-2)^[11]。研究表明,信号分子 AHLs 能增强耐药质粒的接合转移,促进耐药基因的扩散^[12-13]。而作为细菌种间交流的信号分子 AI-2 介导的群体感应系统 LuxS/AI-2, 已被证

实能调控细菌的众多重要生理功能包括耐药性^[14-17], 但是否能调控耐药基因的接合转移不得而知。因此,本研究通过分析信号分子 AI-2 对副溶血性弧菌四环素耐药基因接合转移的影响作用,为阐明副溶血性弧菌的耐药传播机制、研制基于群体感应系统的防控副溶血性弧菌耐药性的新技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

副溶血性弧菌 Vp2015094(分离自海水贝)、Vp2016058(分离自海水虾)(耐受四环素,保存于本实验室);大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) K12(耐受萘啶酮酸,中国工业微生物菌种保藏中心)。

1.1.2 主要试剂和仪器

信号分子 AI-2, 根据文献[14]方法制备及测定活性。

Luria-Bertani (LB)培养基: 酵母粉(5.0 g/L)、胰蛋白胍(10.0 g/L)(英国 Oxoid 公司)、NaCl (10.0 g/L)(国药集团化学试剂有限公司)、琼脂(15 g/L)(固体培养基中加入)。

LBS 培养基: LB 培养基中添加 NaCl (20 g/L)。

伊红美蓝琼脂(eosin-methylene blue agar, EMB)培养基、MH 琼脂(mueller-hinton agar, MHA)培养基(北京陆桥技术股份有限公司); 质粒小提试剂盒、细菌总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]; 逆转录(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent kit with gDNA Eraser、荧光定量 PCR (real time PCR)试剂盒 TB GreenTM Premix Ex TaqTM

II、DNA marker DL2000[宝生物工程(大连)有限公司]; 盐酸四环素(25 g)、萘啶酮酸(25 g)、扩增用引物(序列见表 1)[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

LightCycler 480 II 荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司); TC-96/G/H(B)3 PCR 仪(杭州博日科技有限公司); nanophotometer 微量核酸蛋白测定仪(德国 Implen 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 接合转移实验

将活化后的供体菌副溶血性弧菌 Vp2015094、Vp2016058 分别接种于 10 mL LBS 液体培养基(含 20 μg/mL 四环素), 受体菌大肠埃希氏菌 K12 接种于 10 mL LB 液体培养基(含 100 μg/mL 萘啶酮酸), 36 °C、150 r/min 培养 10~12 h。分别将 3 株菌的培养液 8000 r/min 离心 10 min, 获取菌体, 弃去培养液, 加入新鲜的 LB 液体培养基, 重新悬浮菌体后再离心, 按照此操作, 对菌体洗涤 3 次, 确保将抗生素除尽。将洗涤后的菌体用 LB 液体培养基调节至麦氏浊度为 0.5, 然后将供体菌

Vp2015094、Vp2016058 分别与受体菌大肠埃希氏菌 K12 菌以体积比 1:1 混合, 36 °C 静置培养 4 h 进行接合反应。将接合后菌液进行适当倍数稀释后, 涂布 EMB 平板(含 20 μg/mL 四环素和 100 μg/mL 萘啶酮酸), 于 36 °C 培养 18~24 h。从 EMB 平板上挑取接合子单菌落接种于 10 mL LB 液体培养基(含 20 μg/mL 四环素和 100 μg/mL 萘啶酮酸)中, 同时将供体菌副溶血性弧菌 Vp2015094、Vp2016058 接种于 LBS 液体培养基(含 20 μg/mL 四环素)中, 36 °C、150 r/min 培养 18~24 h。将菌液稀释至麦氏浊度约 0.5, 涂布于 MHA 平板上, 待菌液吸收后, 采用纸片扩散法进行四环素和萘啶酮酸的药敏实验, 36 °C 培养 18~24 h^[21]。同时, 对接合子和供体菌的液体培养物采用质粒小提试剂盒提取质粒, 并以质粒为模板采用 PCR 扩增四环素耐药基因, 判定四环素耐药基因转移情况。同时, 将供体菌和受体菌分别培养后涂布 EMB 平板(含 20 μg/mL 四环素和 100 μg/mL 萘啶酮酸), 以排除自发突变产生具有抗性的假接合子。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

| 分类 | 名称 | 序列(5'→3') | 目的基因 | 文献 |
|---------------------|--------|----------------------------|-----------------|------|
| 耐药基因扩增引物 | tetB-F | TTGGTTAGGGCAAGTTTTG | <i>tetB</i> | [18] |
| | tetB-R | GTAATGGGCCAATAACACCG | | |
| | tetM-F | GTRAYGAACTTTACCGAATC | <i>tetM</i> | [19] |
| | tetM-R | ATCGYAGAAGCGGRTAC | | |
| | tetE-F | AAACCACATCCTCCATACGC | <i>tetE</i> | [18] |
| | tetE-R | AAATAGGCCACAACCGTCAG | | |
| | 16S-F | CAGCTCGTGTGTGAAATGT | <i>16S rRNA</i> | [20] |
| | 16S-R | CGTAAGGGCCATGATGACTT | | |
| 接合相关基因荧光定量 PCR 扩增引物 | traF-F | AGCCACCACCATTACAGCATCAC | <i>traF</i> | 本研究 |
| | traF-R | GCGGTCAGATAAGAGGCAGAAACG | | |
| | trbB-F | TGCTTCGTACCACACTGCGTTATC | <i>trbB</i> | |
| | trbB-R | TCTCGCTGAATC GGC ATG AATGG | | |

1.2.2 AI-2 对接合频率的影响

向 1.2.1 中供体菌和受体菌 1:1 (V:V)混合培养液中分别添加终浓度为 6、15 和 30 μmol/L 的信号分子 AI-2, 以不添加 AI-2 信号分子为对照组, 36 °C 静置培养 4 h。取一定量混合菌液用无菌生理盐水进行 10 倍梯度稀释, 取适宜稀释度的菌液 100 μL 涂布于 EMB 平板(含 20 μg/mL 四环素和 100 μg/mL 萘啶酮酸), 于 36 °C 培养 18~24 h, 计算接合子数量(Nc, CFU/mL)。同时取等量菌悬液涂布于 EMB 平板(含 100 μg/mL 萘啶酮酸), 于 36 °C 培养 18~24 h, 计算受体菌数量(Nr, CFU/mL)。根据接合子数量和受体菌数量计算接合频率(F), 计算公式为式(1):

$$F=Nc/Nr \quad (1)$$

1.2.3 AI-2 对接合调控相关基因的影响

取 1.2.2 中接合后菌液 1 mL, 12000 r/min 离心 5 min, 采用细菌总 RNA 提取试剂盒提取沉淀菌体 RNA, 采用逆转录试剂盒进行 RT-PCR, 再通过 real time PCR 测定菌株接合转移调控相关基因 *traF* 和 *trbB* 的转录水平, 以 *16S rRNA* 基因作为内参基因^[13]。荧光定量 PCR 反应体系包括: 预混液(2×) 10 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各 0.8 μL, cDNA 2 μL(约 100 ng), 用无菌水补足 20 μL; 反应条件为: 95 °C 30 s, 40 个循环的 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 溶解曲线反应条件为 95 °C 5 s, 60 °C 60 s。

1.2.4 数据分析

实验结果以平均值±标准偏差表示, 数据的差异性采

用 t 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, $P < 0.01$ 表示具有极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 接合子的鉴定

供体菌副溶血性弧菌 Vp2015094 和 Vp2016058 含有耐药质粒, 携带四环素耐药基因, 而受体菌大肠埃希氏菌 K12 对萘啶酮酸耐药, 可以通过菌株的耐药性和耐药基因的转移来鉴定接合子。通过药敏实验发现, Vp2015094、Vp2016058 与 K12 产生的接合子都能耐受四环素和萘啶酮酸 2 种药物(见图 1)。同时提取接合子和供体菌质粒, 并以此为模板进行 PCR 扩增, 检查耐药基因转移情况。如图 2 所示, Vp2015094 含有 *tetB* 和 *tetM* 基因, 其接合子也能扩增出这 2 个基因, Vp2016058 含有 *tetB* 和 *tetE* 基因, 其接合子也能扩增出这 2 个基因, 而受体体 K12 则不含这 3 个基因。综合药敏实验和基因扩增结果, Vp2015094 和 Vp2016058 的四环素耐药基因可以通过接合转移传递到大肠埃希氏菌 K12 中。

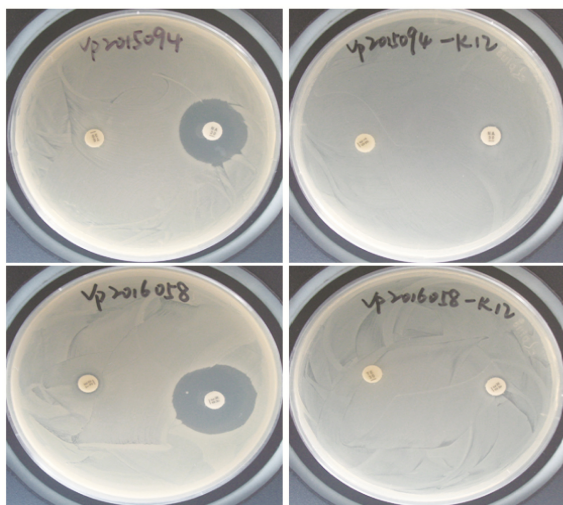
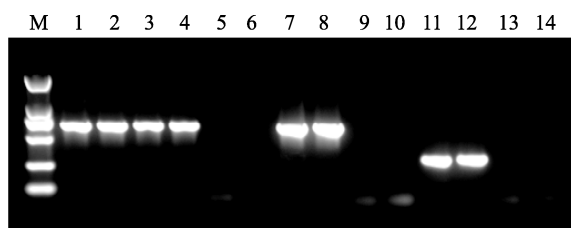


图 1 副溶血性弧菌及接合子对四环素和萘啶酮酸的药敏实验
Fig.1 Drug sensitivity test for tetracycline and nalidixic acid of *Vibrio parahaemolyticus* and conjugants



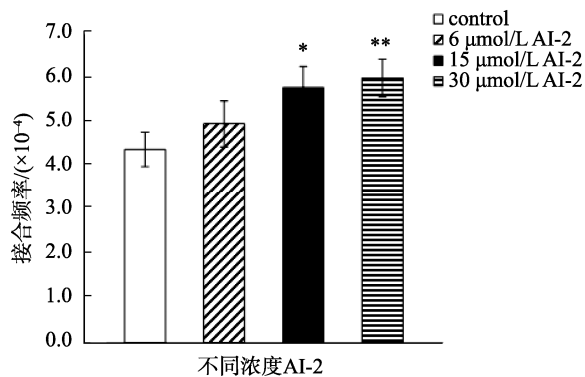
注: M: DL2000; 1~6: *tetB* (从左至右依次为 Vp2015094、Vp2016058、Vp2015094-K12 接合子、Vp2016058-K12 接合子、K12、空白); 7~10: *tetM* (从左至右依次为 Vp2015094、Vp2015094-K12 接合子、K12、空白); 11~14: *tetE* (从左至右依次为 Vp2016058、Vp2016058-K12 接合子、K12、空白)。

图 2 副溶血性弧菌及接合子的四环素耐药基因扩增
Fig.2 Amplification of tetracycline resistance genes of *Vibrio parahaemolyticus* and conjugants

2.2 信号分子 AI-2 对接合频率的影响

Vp2015094 和 Vp2016058 在与大肠埃希氏菌 K12 接合中, 两者相对应的接合频率均随 AI-2 浓度的增加而升高, 但升高的程度不同。如图 3 所示, Vp2015094 与大肠埃希氏菌 K12 接合体系中, 6、15、30 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2 分别使接合频率提高了 13%、32%、37%, 与对照组(control)相比, 15 $\mu\text{mol/L}$ AI-2 处理后, 接合频率显著增高($P < 0.05$), 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2 处理后, 接合频率极显著增高($P < 0.01$)。如图 4 所示, Vp2016058 与 K12 接合体系中, 不同浓度 AI-2 促进接合频率提高了 88%、208%、224%, 与对照组相比, 3 个浓度的 AI-2 都极显著地增加接合频率($P < 0.01$)。对于 2 株副溶血性弧菌在接合反应中的不同表现, 推测菌株个体的差异性对接合频率有影响。通过两组接合体系结果表明, AI-2 能促进质粒的接合转移从而导致耐药基因的转移扩散, 且接合频率的提高与 AI-2 浓度有剂量依赖关系。

信号分子是细菌交流的工具, 当环境中存在信号分子时, 菌体感知信号分子会直接导致细菌与细菌接触机会的增加, 势必会引起接合频率的变化。以往的研究更多的是探讨 I 型群体感应信号分子 AHLs 对耐药基因接合转移的影响作用。以含有耐药质粒 RP4 在大肠埃希氏菌 MG1655 之间的接合转移作为群体感应对接合转移影响的研究模型, 探讨了 AHLs 对接合频率的影响, 结果发现低浓度的信号分子 C8 能明显增强四环素对 RP4 质粒接合转移的促进作用, 当供体菌和受体菌间的信息交流被群体感应抑制剂 R3P 阻断时, RP4 的接合转移就会显著下降, 这说明群体感应系统确实能够维持接合反应的稳定发生^[12,22]。同样, 外源添加 AHLs 能有效促进同种细菌间耐药基因的水平转移, 其中 C8-HSL 的影响作用最明显, 可促进接合频率提高 28.6 倍; 此外, 添加外源信号分子分泌菌也能不同程度地提高抗性基因的水平转移, 效果最显著地可增强 17.4 倍^[23-24]。本研究中接合频率提高水平与其他研究报道不同, 推测可能是因为信号分子种类不同, 在种间的基因水平转移作用低于种内, 也可能是供体菌和耐药质粒个体差异所致。



注: *: AI-2 组与对照组比较, $P < 0.05$; **: AI-2 组与对照组比较, $P < 0.01$, 下同。

图 3 AI-2 对副溶血性弧菌 Vp2015094 接合频率的影响($n=3$)
Fig.3 Effects of AI-2 on conjugation frequencies of *Vibrio parahaemolyticus* Vp2015094 ($n=3$)

2.3 信号分子 AI-2 对接合调控相关基因转录水平的影响

已有研究表明 *traF* 是质粒接合转移必不可少的基因, *traF* 基因突变可以使其接合转移功能丧失, 回补该基因可以恢复接合转移功能, 对水平转移过程具有正调控作用^[25-26]。*trbB* 基因与质粒接合相关, 为质粒配对和转移复制的调控基因, 主要负责供体菌和受体菌细胞的接触和 DNA 跨膜转运过程^[27]。本研究通过实时荧光定量 PCR 测定信号分子 AI-2 对接合调控相关基因 *traF* 和 *trbB* 转录水平的影响。

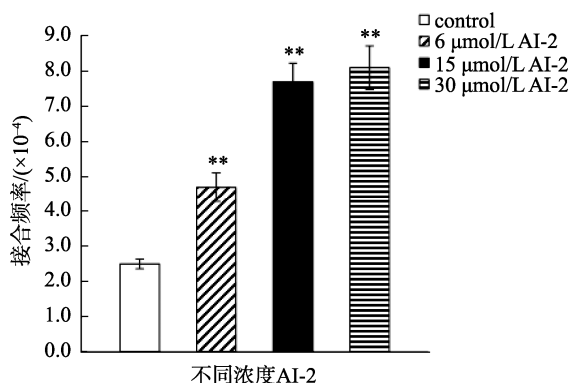


图 4 AI-2 对副溶血性弧菌 Vp2016058 接合频率的影响(n=3)

Fig.4 Effects of AI-2 on conjugation frequency of *Vibrio parahaemolyticus* Vp2016058 (n=3)

在 Vp2015094 与大肠埃希氏菌 K12 接合体系中, 如图 5 所示, 6、15 μmol/L 的 AI-2 对 *traF* 和 *trbB* 的转录水平没有显著影响, 30 μmol/L AI-2 能显著提高 Vp2015094 中 *traF* 基因的转录水平($P<0.05$), 转录水平增加了 18%。在 Vp2016058 与大肠埃希氏菌 K12 接合体系中, 如图 6 所示, 6、15 μmol/L 的 AI-2 对 *traF* 和 *trbB* 的转录水平没有显著影响, 30 μmol/L AI-2 能显著提高 *traF* 和 *trbB* 基因的转录水平($P<0.05$), 转录水平分别增加了 25%和 19%。这些结果表明较高浓度的 AI-2 能提高 *traF*、*trbB* 的转录水平, 推测信号分子 AI-2 主要通过促进 *traF*、*trbB* 基因转录水平来提高耐药质粒接合频率。类似的研究结果证实群体感应信号分子 AHL (C8-HSL)能增强耐药质粒 RP4 的接合转移基因 *traF*、*trbBp* 等的表达水平^[13], 也解释了 C8-HSL 提高了质粒接合频率的原因^[23-24]。这些研究表明群体感应系统具有调节细菌接合转移功能, 参与调控质粒的接合转移机制。虽然低浓度(6、15 μmol/L)的 AI-2 对接合相关基因的表达水平没有明显影响, 但同样会促进接合频率的提高。接合转移是一个复杂的生理过程, 低浓度的 AI-2 可能通过调控其他系统来促进质粒的接合转移, 有待进一步的研究确定。

3 结论与讨论

本研究以影响海产品质量安全的副溶血性弧菌为对象, 分别构建了副溶血性弧菌 Vp2015094 和 大肠埃希氏菌 K12、副溶血性弧菌 Vp2016058 和 K12 的接合体系; 15、

30 μmol/L 浓度 AI-2 能显著提高 Vp2015094 的接合频率 ($P<0.05$), 6、15、30 μmol/L 浓度 AI-2 能极显著提高 Vp2016058 的接合频率($P<0.01$); 30 μmol/L 浓度 AI-2 能显著提高 Vp2015094 的 *traF* 的转录水平以及 Vp2016058 的 *traF*、*trbB* 的转录水平($P<0.05$), 表明 AI-2 可能通过调控接合转移相关基因的表达水平来提高接合频率。本研究可为阐明副溶血性弧菌的耐药传播机制、研制基于群体感应系统的耐药性控制技术奠定基础。

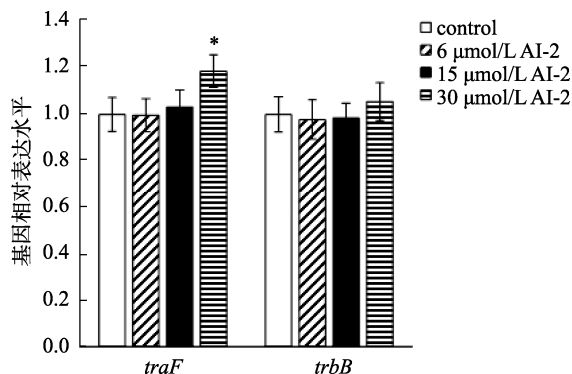


图 5 AI-2 对 Vp2015094 接合相关基因表达水平的影响(n=3)

Fig.5 Effects of AI-2 on the transcription level of conjugation regulated genes in Vp2015094 (n=3)

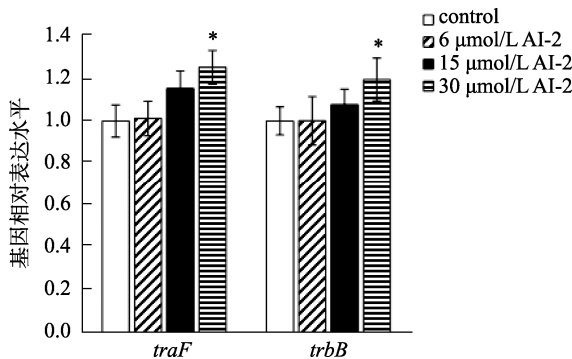


图 6 AI-2 对 Vp2016058 接合相关基因表达水平的影响(n=3)

Fig.6 Effects of AI-2 on the transcription level of conjugation regulated genes in Vp2016058 (n=3)

细菌的代谢调控非常复杂, 目前尚未见关于 AI-2 对接合转移的调控作用及机制的报道, 后续将通过转录组测序技术分析并挖掘 AI-2 对耐药质粒接合转移的调控通路和机制, 此外, 还可通过敲除 AI-2 合成关键酶的基因 *luxS*, 分析 *luxS* 基因缺失株与野生株耐药质粒接合的差异和分子机制, 从外部添加和内部阻断 AI-2 两种方式来进一步深入研究 LuxS/AI-2 群体感应系统对副溶血性弧菌耐药基因转移的调控机制。

参考文献

[1] HONDA T, IIDA T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins [J]. Rev Med Microbiol, 1993, 4: 106-113.
 [2] 付萍, 王连森, 陈江, 等. 2015 年中国大陆食源性疾病暴发事件监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(1): 64-70.

- FU P, WANG LS, CHEN J, *et al.* Analysis of surveillance data on foodborne disease outbreaks in mainland China in 2015 [J]. *Chin J Food Hyg*, 2019, 31(1): 64–70.
- [3] 毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅. 用文献综述法估计我国食源性副溶血性弧菌病发病率[J]. *中华疾病控制杂志*, 2013, 17(3): 265–267.
- MAO XD, HU JF, LIU XM. Study on incidence of foodborne disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* by literature review method [J]. *Chin J Dis Control Prev*, 2013, 17(3): 265–267.
- [4] 王红, 赵鹏, 杜悦, 等. 副溶血弧菌耐药传播及机制研究进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(21): 2685–2688.
- WANG H, ZHAO P, DU Y, *et al.* Research progress in the transmission and mechanism of drug resistance in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2018, 28(21): 2685–2688.
- [5] 郑林, 祝令伟, 郭学军, 等. 副溶血性弧菌耐药基因的研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2019, 53(6): 80–85.
- ZHENG L, ZHU LW, GUO XJ, *et al.* Advances in antimicrobial resistance genes in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Chin J Vet Drug*, 2019, 53(6): 80–85.
- [6] THOMAS CM, NIELSEN KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(9): 711–721.
- [7] CARATTOLI A. Plasmids and the spread of resistance [J]. *Int J Med Microbiol*, 2013, 303: 298–304.
- [8] SVARA F, RANKIN DJ. The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance [J]. *BMC Evol Biol*, 2011, 11: 130.
- [9] SINGH PK, MEIJER WJJ. Diverse regulatory circuits for transfer of conjugative elements [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 358(2): 119–128.
- [10] MILLER MB, BASSLER BL. Quorum sensing in bacteria [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55: 165–199.
- [11] MCDUGALD D, RICE SA, KJELLEBERG S. Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 387(2): 445–453.
- [12] ZHANG Y, MA Q, SU Q, *et al.* A study on the role that quorum sensing play in antibiotic-resistant plasmid conjugative transfer in *Escherichia coli* [J]. *Ecotoxicology*, 2018, 27(8): 1–8.
- [13] ZHU L, CHEN T, XU L, *et al.* Effect and mechanism of quorum sensing on horizontal transfer of multidrug plasmid RP4 in BAC biofilm [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 698: 134236.
- [14] 林才云, 江艳华, 姚琳, 等. 信号分子 AI-2 的体外合成及其对副溶血性弧菌四环素耐药性的调控作用[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(5): 1321–1331.
- LIN CY, JIANG YH, YAO L, *et al.* *In vitro* synthesis of AI-2 and its effect on tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microbiol China*, 2020, 47(5): 1321–1331.
- [15] 林才云, 姚琳, 李凤铃, 等. LuxS/AI-2 群体感应系统及其对细菌致病性和耐药性的调控[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(18): 5983–5991.
- LIN CY, YAO L, LI FL, *et al.* LuxS/AI-2 quorum sensing of bacteria and its regulation on pathogenicity and antimicrobial resistance [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(18): 5983–5991.
- [16] JU X, LI J, ZHU M, *et al.* Effect of the *luxS* gene on biofilm formation and antibiotic resistance by *Salmonella* serovar Dublin [J]. *Food Res Int*, 2018, 107: 385–393.
- [17] KAUR A, CAPALASH N, SHARMA P. Expression of *Meiothermus ruber luxS* in *E. coli* alters the antibiotic susceptibility and biofilm formation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104: 4457–4469.
- [18] NG LK, MARTIN I, ALFA M, *et al.* Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes [J]. *Mol Cell Probes*, 2001, 15: 209–215.
- [19] KOO HJ, WOO GJ. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products [J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 145(2-3): 407–413.
- [20] 汪映. 副溶血性弧菌群体感应与调控的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- WANG Y. A preliminary research on quorum sensing and regulation of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [21] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. M45 3rd edition [Z]. 2016.
- [22] 苏冰梅. 基于群体感应信号分子的抗生素对抗性质粒接合转移影响的研究[D]. 福州: 福州大学, 2016.
- SU BM. Studies on the effects of antibiotics on conjugative transfer of resistant plasmid based on quorum-sensing signaling molecules [D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2016.
- [23] 陈涛. 群体效应对饮用水活性炭深度处理中抗生素抗性基因水平转移的作用及调控研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- CHEN T. Effects of quorum sensing on antibiotic resistance promotion in drinking water during biological activated carbon treatment [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018.
- [24] ZHENG J, CHEN T, CHEN H. Antibiotic resistance promotion in drinking water during biological activated carbon treatment: Is it influenced by quorum sensing? [J]. *Sci Total Environ*, 2018, 612: 1–8.
- [25] WATERS VL, STRACK B, PANSEGRAU W, *et al.* Mutational analysis of essential IncP alpha plasmid transfer genes *traF* and *traG* and involvement of *traF* in phage sensitivity [J]. *J Bacteriol*, 1992, 174(20): 6666–6673.
- [26] SAKAI H, KOMANO T. DNA replication of IncQ broad-host-range plasmids in gram-negative bacteria [J]. *Biosci Biotechnol Bioch*, 1996, 60(3): 377–382.
- [27] CHRISTIE PJ, ATMAKURI K, KRISHNAMOORTHY V, *et al.* Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2005, 59: 451–485.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



王 婷, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品中生物危害物检测与控制。
E-mail: wangting9583@stu.ouc.edu.cn



江艳华, 高级工程师, 主要研究方向为水产品中生物危害物检测与控制。
E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn



王 鹏, 教授, 主要研究方向为海洋微生物。
E-mail: pengwang@ouc.edu.cn