

假单胞菌属中新型 Inc_{pGRT1} 质粒的遗传特性及其潜在传播风险

李昕悦^{1,2}, 王 鹏², 陈方舟², 穆小飞², 卢秀慧², 贺家琪², 郑亚丽², 周冬生^{1,2}, 殷 喆²

摘要 目的 分析来自假单胞菌的 Inc_{pGRT1} 质粒的基因组结构和遗传特征,阐明其潜在的传播风险。**方法** 对临床分离菌株 15420352 进行分纯和保种后提取基因组 DNA,随后进行全基因组测序。测序获得了质粒 p420352-strA 的完整序列,并对其进行质粒型别判断。对所有 5 个已测序的同型别质粒进行了骨架区和外源插入区的精细注释,其中包括本研究中测序的 1 个质粒 p420352-strA 和来自 GenBank 的 4 个质粒。主要通过 RAST、Plasmidfinder、Blast、ResFinder 和 ISfinder 等核定质粒的 ORFs 并筛查耐药毒力等相关的关键基因。**结果** 5 个质粒被划分为新的 Inc_{pGRT1} 型质粒。它们均存在保守的 Inc_{pGRT1} 骨架标记,除主复制子 repA_{IncGRT1} 外,还筛查到这些质粒均获取了一个辅复制子。5 个 Inc_{pGRT1} 质粒

携带了至少 3 个不同的主要外源插入区: *srp* 区域、*msr* 区域、Tn5053 家族转座子。这些质粒中共发现 3 个已知的涉及 2 类抗生素耐药和重金属抗性的基因: *strA*、*strB*、*mer*。并发现这些质粒里携带了至少 1 种毒力因子 *msr* 和 5 种关键的转运蛋白 *srp*、*emrE*、*mod*、*phn* 及 *lpt*。**结论** Inc_{pGRT1} 型质粒已经成为一些耐药基因及毒力基因在假单胞菌属中积累和传播的重要载体,并提高了菌株的环境适应性。

关键词 假单胞菌属;移动元件;质粒;比较基因组学

中图分类号 R 378.99

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1261-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.003

2023-05-21 接收

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2022YFC2303900)

作者单位:¹ 安徽医科大学基础医学院,合肥 230032

² 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所,病原微生物生物安全国家重点实验室,北京 100071

作者简介:李昕悦,女,硕士研究生;

殷 喆,男,博士,副研究员,责任作者,E-mail: jerry9yin@163.com;

周冬生,男,博士,研究员,博士生导师,责任作者,E-mail: dongshengzhou1977@gmail.com

假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 属于假单胞菌科 (*Pseudomonadaceae*) 假单胞菌目 (*Pseudomonadales*), 包含 200 多个亚种^[1]。假单胞菌属菌多为条件致病菌,对人和动物均有致病性,并且有很强的环境适应性。细菌感染及耐药率的上升,很大程度上与质粒的传播相关。质粒是细菌染色体外能自主复制的环状 DNA 分子,可通过接合在细菌之间进行水平转移^[2]。目前根据质粒不相容性 (plasmid incompatibility) 对质粒进行分类的方法已经非常普遍^[3]。

obtaining the optimal irradiation dose and extract concentration, the cells were divided into control group, model group and Hudi extract group (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$), the control group was pseudo-irradiated and the other two groups received 6 Gy of ionizing radiation, and the Hudi enteric extract group was pre-treated with drugs 2 h before irradiation. Apoptosis was detected by Annexin V-PI double staining; cell senescence was detected by β -galactosidase (β -Gal) staining; reactive oxygen species was detected by DCFH-DA fluorescent probe; the corresponding protein expression of p16, p21, Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD2) was detected by Western blot. **Results** The proliferation of IEC-6 cells was inhibited by radiation doses ranging from 4 Gy to 10 Gy ($P < 0.001$); the concentrations of 40 and 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Hudi enteric extract increased the survival rate of irradiated IEC-6 cells ($P < 0.001$), and the apoptosis rate, β -Gal positivity rate and DCFH-DA fluorescence intensity in the Hudi enteric extract group were lower than those in the model group ($P < 0.05$). The protein expressions of CAT and SOD2 in the Hudi extract group were higher than those in the model group ($P < 0.05$), and the protein expressions of p16 and p21 were lower than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of action of Hudi enteric capsules that attenuate radiation damage in IEC-6 cells may be related to the inhibition of reactive oxygen species production, reduction of oxidative stress, and attenuation of cellular senescence and apoptosis.

Key words Hudi enteric extracts; ionizing radiation; oxidative stress; senescence

已报道的假单胞菌中的质粒 Inc 群包括 IncP-1 至 IncP-14、Inc_{pRBL16} 等^[4]。如今可以获得的假单胞菌中的质粒全序不断增多,其中很多质粒尚不能归于现有的 Inc 群,给假单胞菌中质粒的遗传特性研究造成很大的困难。该研究采用生物信息学方法,为新的 Inc_{pGRT1} 型别的质粒的保守性及多态性,以及该型别质粒之间的演化关系提供了更深入的见解。

1 材料与方法

1.1 菌株来源与鉴定 菌株 15420352 分离自湘雅医院呼吸内科的 50 岁肺部感染女性患者的尿液样本。原始菌种记录为恶臭假单胞菌。本研究对其 16S rDNA 基因扩增测序进一步确定菌种。

1.2 药敏试验 使用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析仪对菌株 15420352 进行药敏 MIC 检测,依据美国临床与实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2020 标准判读结果。

1.3 质粒测序及组装 对菌株 15420352 进行三代测序以获得质粒的完整序列,利用德国 Qiagen 公司的 Ultra Clean[®] Microbial DNA Isolation kit (CAT. 12224-250) 试剂盒,提取恶臭假单胞菌 15420352 的基因组 DNA。构建均值约 15 kb(片段大小 10 ~ 20 kb)的 DNA 文库,通过 PacBio RSII 测序仪进行三代测序。同时,构建均值约 400 bp 左右(片段大小 150 ~ 600 bp)的双端测序(paired-end)文库,通过 HiSeq 测序仪进行二代测序。利用 Proovread 软件通过短的片段校正 PacBio 长的片段,校正过的 PacBio 片段通过 HGAP v3.0(基因组覆盖率 100 ×)进行拼接组装,最终获得恶臭假单胞菌 15420352 的完整染色体及质粒序列。

1.4 质粒的生物信息学和比较基因组学分析 获得质粒全序列以后,首先通过 RAST 2.0 (<https://rast.nmpdr.org/>) 初步预测质粒的开放阅读框(open reading frame, ORF),利用 Plasmidfinder 2.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) 确定质粒的复制子基因,在此基础上,利用 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 等进行每个基因的功能注释。利用在线数据库 ResFinder (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>) 和 CARD (<https://card.mcmaster.ca>) 对耐药基因进行筛查,ISfinder (<https://www-is.biotoul.fr>)、INTEGRALL ([\[bio.ua.pt/\]\(http://bio.ua.pt/\)\) 和 The Transposon Registry \(<https://transposon.lstmed.ac.uk/tn-registry>\) 对质粒的外源插入区结构进行精细注释。注释列表完成后,利用 Inkscape 1.0 绘制质粒整体结构圈图、质粒线性结构比较图和外源插入区线性结构比较图。](http://integrall.</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.5 序列登录号 进行全基因组测序后,得到质粒 p420352-strA 序列,提交至 GenBank,登录号为 MT074087。

2 结果

2.1 菌种鉴定及药敏结果测定 菌株 15420352 经 16S rDNA 扩增初步确定菌种,后将全基因组 DNA 序列与恶臭假单胞菌参考菌株 KT2440(登录号:NC_002947.4) 进行平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI) 比对分析 (<http://www.ezbiocloud.net/tools/ani>),一般以 95% 做为判定是否为同一菌种的阈值,ANI 值计算结果为 96.99%,最终核定该株菌为恶臭假单胞菌。野生株对 β-内酰胺类、头孢类、青霉烯类、喹诺酮类抗生素耐药,对阿米卡星及四环素类抗生素敏感,见表 1。

表 1 15420352 MIC 测定结果

抗生素	菌株 150420352
β-内酰胺类	
替卡西林/克拉维酸	≥128/R
哌拉西林/他唑巴坦	≥128/R
头孢类	
头孢他啶	≥64/R
头孢吡肟	≥32/R
青霉烯类	
亚胺培南	≥16/R
美罗培南	≥16/R
氨基糖苷类	
阿米卡星	≤2/S
妥布霉素	≥16/R
链霉素	≥32/R
喹诺酮类	
环丙沙星	≥4/R
左氧氟沙星	≥8/R
四环素类	
米诺环素	4/S

2.2 Inc_{pGRT1} 型质粒遗传特性

2.2.1 测序质粒 p420352-strA 及纳入分析的质粒概述 质粒 p420352-strA 大小为 153.6 kb,平均 GC 含量为 56.67%,共预测得到 174 个开放读码框,见图 1。本研究纳入分析的质粒共 5 个,见表 2,除上述本研究测序质粒,另有截至 2022 年 9 月 1 日从

表 2 Inc_{pGRTI} 型别质粒的基本特征

质粒名称	登录号	宿主菌	总长度 (bp)	G + C 含量 (%)	骨架区 长度(bp)	ORF 数量	与 <i>repA</i> _{Inc_{pGRTI}} 核苷酸
							同源性(覆盖率 + 相似性)
p420352-strA	MT074087	恶臭假单胞菌 15420352	153 678	56.67	99 520	174	(100% + 96.27%)
pGRT1	HM626202	恶臭假单胞菌 DOT-T1E	133 451	55.81	85 232	145	(100% + 100%)
pZDHY414	CP064947	黄褐假单胞菌 ZDHY414	150 273	56.81	96 243	171	(100% + 96.35%)
pPp1290	CP039372	恶臭假单胞菌 1290	114 265	54.59	109 770	128	(100% + 96.35%)
pBYT5-2	CP097491	假单胞菌属 BYT-5	136 400	57.39	122 483	150	(100% + 96.01%)

GenBank 中检索到的 4 个质粒, 包括 pGRT1、pZDHY414、pPp1290、pBYT5-2。这 5 个质粒的复制子 (replication) 基因与 *repA*_{Inc_{pGRTI}} 的同源性 ≥ 95%。且均包含 Inc_{pGRTI} 型质粒的保守骨架结构。由于不能归于现有的 Inc 群, 均属于新的 Inc 型别 Inc_{pGRTI}。pGRT1 在恶臭假单胞菌 DOT-T1E 中被发现, 因为该质粒为最早测序的该型别质粒, 本研究将其作为 Inc_{pGRTI} 型质粒的参考质粒。每个质粒都可分为骨架区和多个独立的外源插入区, 外源插入区分别插入在不同的骨架区位点。

源性 > 80%。此外, 这些质粒的复制起始区各含有两个编码新型复制子的基因, 除了上述主复制子 *repA*_{Inc_{pGRTI}}, 均还含有一个辅复制子, 为编码 Rep₃ 家族复制起始蛋白 RepA 的 *repA*。Inc_{pGRTI} 型质粒的保守骨架结构包括: *repA*_{Inc_{pGRTI}} 及其 iterons (复制区)、*parAB* (质粒分割区)、*dtr2* 和几个 *tra* 基因 (接合转移区), 以及其他调控质粒稳定性相关的基因 *umuCD*、*mobD*、*dnaG* 等。其中, pBYT5-2 与其他四个质粒的骨架区差异最大, *orf1260-to-orf390* 区是其独有的骨架区结构, 长 4.2 kb, 该区域包括磷酸盐转运系统 (phosphonate transport system, *phnCDE*) 基因座位和脂多糖转运酶 (LPS export ABC transporter permease, *lptGF*) 基因座位, 是菌体内重要的代谢相关基因。此外, pBYT5-2 骨架区还发现了 *mod* 区, 该区有钼酸盐转运蛋白 (molybdate ABC transporter, *modABE*) 基因, 这些基因均参与调控宿主关键的生理功能。p420352-strA 和 pZDHY414 的同源性最强, 这两个质粒的差异只在于 p420352-strA 的骨架区存在一个 *orf1344-to-orf990* 区。

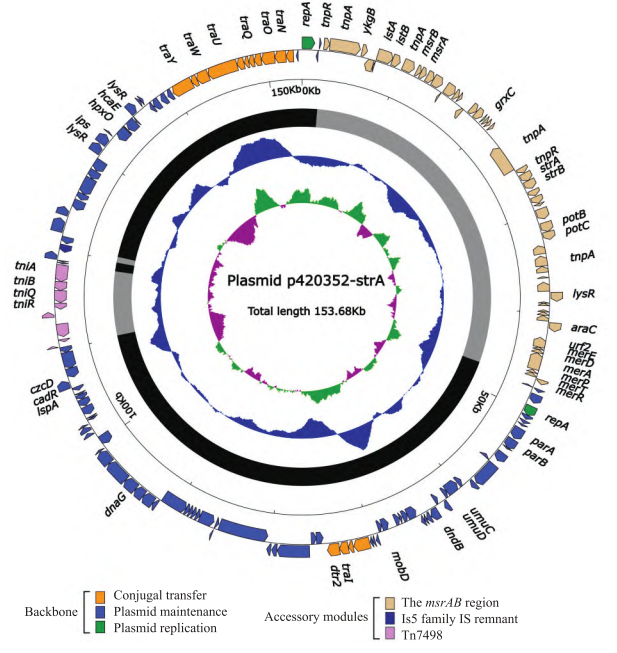


图 1 p420352-strA 全序列示意图

最内环表示 GC 偏移, 向外和向内分别表示 G 和 C 的相对含量 G > C 和 G < C; 次内环代表 GC 含量, 向内、向外分别表示低于、高于平均 GC 含量; 最外环表示基因分布情况, 顺时针和逆时针的色块分别表示基因方向为正向和反向; 次外环灰色区为质粒骨架区, 黑色区为外源插入区

2.2.2 Inc_{pGRTI} 型质粒的骨架区比较分析 Inc_{pGRTI} 型的 5 个质粒的骨架区可进一步分为与质粒复制起始相关的区域, 维持质粒稳定性相关的区域和接合转移区, 见图 2。这 5 个质粒 > 52% 的骨架区的同

源性 > 80%。此外, 这些质粒的复制起始区各含有两个编码新型复制子的基因, 除了上述主复制子 *repA*_{Inc_{pGRTI}}, 均还含有一个辅复制子, 为编码 Rep₃ 家族复制起始蛋白 RepA 的 *repA*。Inc_{pGRTI} 型质粒的保守骨架结构包括: *repA*_{Inc_{pGRTI}} 及其 iterons (复制区)、*parAB* (质粒分割区)、*dtr2* 和几个 *tra* 基因 (接合转移区), 以及其他调控质粒稳定性相关的基因 *umuCD*、*mobD*、*dnaG* 等。其中, pBYT5-2 与其他四个质粒的骨架区差异最大, *orf1260-to-orf390* 区是其独有的骨架区结构, 长 4.2 kb, 该区域包括磷酸盐转运系统 (phosphonate transport system, *phnCDE*) 基因座位和脂多糖转运酶 (LPS export ABC transporter permease, *lptGF*) 基因座位, 是菌体内重要的代谢相关基因。此外, pBYT5-2 骨架区还发现了 *mod* 区, 该区有钼酸盐转运蛋白 (molybdate ABC transporter, *modABE*) 基因, 这些基因均参与调控宿主关键的生理功能。p420352-strA 和 pZDHY414 的同源性最强, 这两个质粒的差异只在于 p420352-strA 的骨架区存在一个 *orf1344-to-orf990* 区。

2.2.3 质粒外源插入区 pGRT1 的外源插入区包括一个 4.7 kb 长的 *srp* 区和一个 *ISPa41*, 见图 3。*srp* 区的两端发现了 Tn4653 的残余, Tn4653 为 Tn3 家族转座子。该区域内的溶剂外排 RND 转运体外膜蛋白 (solvent efflux RND transporter outer membrane subunit, *srpABCS*) 基因, 可以使菌体在高浓度有机溶剂如甲苯、苯乙烯和二甲苯的环境中具有高耐受能力, 甚至生长能力。推测这些与细菌环境适应性相关的外排泵基因由移动元件携带并进入菌体中, 导致该菌对甲苯的耐性增强。这一区域内还发现有汞转运 (mercuric transcriptional regulator, *mer*) 基因, 以及多药转运蛋白 (*escherichia coli* multidrug transporter, *emrE*) 基因。因此, 质粒携带的 *srp* 区在提高细菌耐药性方面也发挥了很大作用。此外该区域另有插入序列 *IS_{Ppu12}*、*IS_{Pa73}*、*IS1382* 以及一个 *IS21* 家族 IS 残余的插入。

p420352-strA 和 pZDHY414 的外源插入区主要为 *msr* 区 (图 4) 和一个单元转座子 Tn7498 (图 5)。

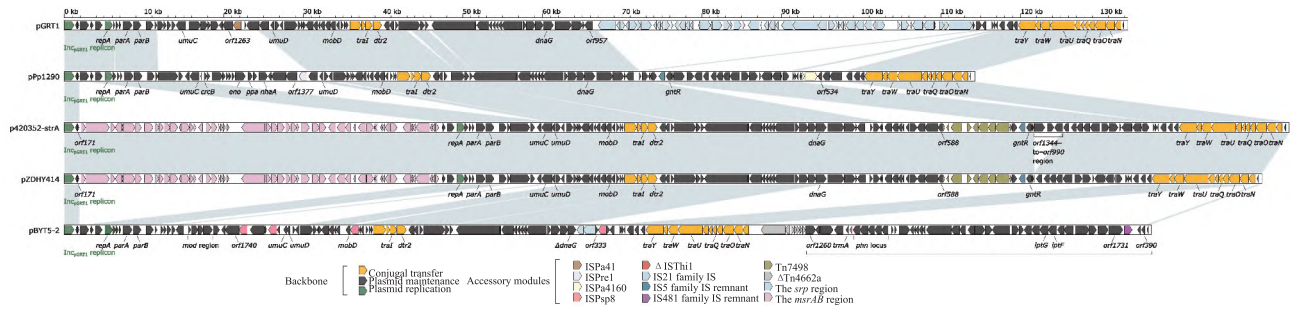


图2 Inc_{pGRT1}质粒序列线性比较图

箭头表示基因,不同颜色代表不同的基因功能分类;阴影部分表示同源区域(核苷酸相似性 >90%)

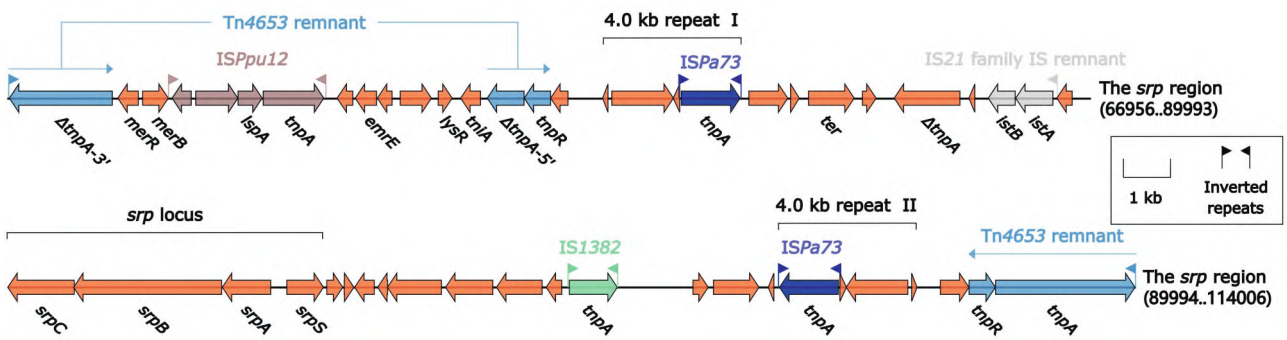


图3 pGRT1 srp 区域

箭头指示基因,不同颜色标示不同的基因功能分类

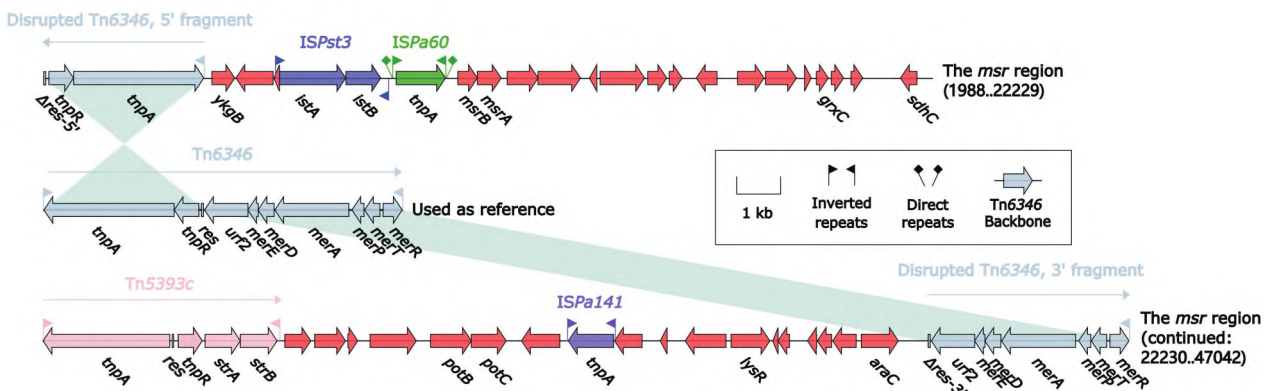


图4 p420352-strA 和 pZDHY414 的 msr 区域

箭头表示基因,不同颜色代表不同的基因功能分类;阴影部分表示同源区域(核苷酸同源性 >90%);Tn5393c 的登录号为 AF262622

在这两个质粒的 *msr* 区中,发现了不完整的 Tn6346 成分,Tn6346 为 Tn3 家族单元转座子,由 Tn5051 的核心转位模块 *tnpA* (转座酶基因)-*tnpR* (解离酶基因)-*res* (重组位点)和 Tn501 的 *mer* 区组成,该转座子在其 *res* 位点被打断为两部分并发生了颠转,分别为该区域两端的 Tn6434 的 5' 端片段和 3' 端片段。Tn5393c 被发现插入到该区域中,Tn5393c 也是 Tn3 家族的单元转座子,其包含两个链霉素类耐药基因

strA 和 *strB*。该区域中还发现了肽甲硫氨酸亚砷还原酶 (peptide methionine sulfoxide reductase, *msrAB*) 基因,比对结果注释为毒力因子。其他的移动元件 *ISPst3*、*ISPa60* 和 *ISPa141* 也在该区域中被发现。

Tn7498 是本研究新发现的一个 Tn5053 亚家族的单元转座子,Tn5053 为 Tn7 家族转座子。最初在黄单胞菌属 W17 中被发现,其骨架区核心转座结构为 *tniABQR*。Tn7498 插入到质粒骨架区基因 *orf588*

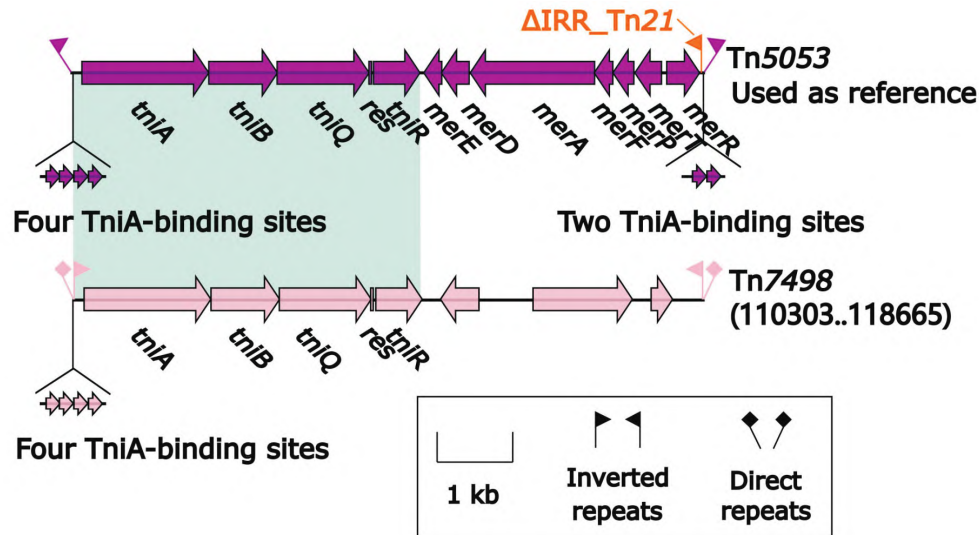


图5 p420352-strA 和 pZDHY414 的 Tn7498 区域

箭头表示基因,不同颜色代表不同的基因功能分类;阴影部分表示同源区域(核苷酸同源性 >90%)

上游的 87 bp 处,并产生了 5 bp 的正向重复序列 (direct repeats, DRs)。Tn7498 未发现其参考元件 Tn5053 中的 *mer* 区。

3 讨论

假单胞菌广泛分布在世界各地的各种环境中,并且质粒在假单胞菌中普遍存在。质粒介导的基因转移不仅在抗生素耐药基因的传播中发挥重要作用,还在微生物降解途径和毒力因子传播中发挥重要作用。为探究假单胞菌属中新型 $\text{Inc}_{\text{pGRTI}}$ 质粒的遗传特性,本研究对 5 个 $\text{Inc}_{\text{pGRTI}}$ 质粒进行了全面的比较基因组学分析。揭示了该型别质粒介导假单胞菌产生耐药性和致病性的潜在风险。

目前该类质粒仅被发现在假单胞菌中传播(搜索截止日期为 2022 年 9 月 1 日),并且这些宿主菌在临床和环境中共有分布。本研究中的 5 个质粒有 3 个来自恶臭假单胞菌,1 个来自黄褐假单胞菌,1 个来假单胞属菌。其中,菌株 1290 分离时间最早,1985 年分离自美国的环境样本^[5],据此推测该类质粒最初来自于环境。

通过对 $\text{Inc}_{\text{pGRTI}}$ 型质粒的比较基因组学分析,更深层次地了解了该型别质粒的保守性以及多样性。该类质粒基因组均发现了两个复制子,其中 $repA_{\text{Inc}_{\text{pGRTI}}}$ 上游发现了 8 个重复的正向序列 iterons,该序列在调控质粒 DNA 复制中起重要作用。5 个质粒包含至少 3 种主要的外源插入区:*srp* 区域、*msr* 区域以及 Tn7498。外源插入区增加了这一类质粒序列的多样性。复杂的转座机制是这些外源插入区形

成的主要原因。

$\text{Inc}_{\text{pGRTI}}$ 型质粒已经成为一些耐药基因以及毒力基因在假单胞菌属中积累和传播的重要载体。在这些质粒的外源插入区中,已经发现了 2 类已知的抗生素耐药和汞金属抗性基因:*strAB* 和 *mer*。在 p420352-strA 和 pZDHY414 两个质粒中,发现了同源性很高的毒力相关的 *msr* 区,均编码两个毒力基因 *msrAB*,这两个基因在细菌黏附及侵袭作用中发挥了重要作用^[6-7]。一些关键的转运蛋白也在该型别质粒中被发现, pGRTI 中包括可以抵抗有机溶剂的外排泵基因 *srpABCS*,根据相关报道携带该质粒的恶臭假单胞菌 DOT-T1E 由于获得了这类相关基因,其可以在高浓度的甲苯溶液中生存,且耐有机溶剂^[8]。该质粒中还发现了 *emrE* 基因,许多研究^[9-10]已发现在不同携带该基因的的菌种中都产生了多种药物的外排现象。在 pBYT5-2 的骨架区发现了编码转运蛋白的 *mod*、*phn*、*lpt*,可以维持宿主的基本生理活动^[11-12]。总之,质粒中这些关键的抗性基因和调控基因可以提高宿主在环境压力下的生存能力。

该研究表明 $\text{Inc}_{\text{pGRTI}}$ 型质粒在假单胞菌中宿主的广泛性及其传播耐药及毒力基因的潜力,假单胞菌可以通过传播这类质粒获得相关基因。该型别质粒已经在临床中分离出,推测其在院内环境中具有广泛传播的潜力,临床防治过程中需要给予重视。

参考文献

[1] Hesse C, Schulz F, Bull C T, et al. Genome-based evolutionary

- history of *Pseudomonas* spp [J]. *Environ Microbiol*, 2018, 20(6): 2142–59.
- [2] San Millan A. Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context[J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26(12): 978–85.
- [3] Helinski D R. A brief history of plasmids [J]. *EcoSal Plus*, 2022, 10(1): eESP00282021.
- [4] Jiang X, Yin Z, Yuan M, et al. Plasmids of novel incompatibility group Inc_{pRBL16} from *Pseudomonas* species[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75(8): 2093–100.
- [5] Laird T S, Leveau J H J. Finished genome sequence of the indole-3-acetic acid-catabolizing bacterium *Pseudomonas putida* 1290 [J]. *Microbiol Resour Announc*, 2019, 8(28): e00519.
- [6] Scheible M, Nguyen C T, Luong T T, et al. The fused methionine sulfoxide reductase MsrAB promotes oxidative stress defense and bacterial virulence in *Fusobacterium nucleatum*[J]. *mBio*, 2022, 13(3): e0302221.
- [7] Nasreen M, Nair R P, McEwan A G, et al. The peptide methionine sulfoxide reductase (MsrAB) of *Haemophilus influenzae* re-pairs oxidatively damaged outer membrane and periplasmic proteins involved in nutrient acquisition and virulence [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(8): 1557.
- [8] Godoy P, García-Franco A, Recio M I, et al. Synthesis of aromatic amino acids from 2G lignocellulosic substrates[J]. *Microb Biotechnol*, 2021, 14(5): 1931–43.
- [9] Sen T, Verma N K. Functional role of YnfA, an efflux transporter in resistance to antimicrobial agents in *Shigella flexneri*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2022, 66(7): e0029322.
- [10] Li J, Sae Her A, Traaseth N J. Asymmetric protonation of glutamate residues drives a preferred transport pathway in EmrE [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(41): e2110790118.
- [11] Stosiek N, Talma M, Klimek-Ochab M. Carbon-phosphorus lyase—the state of the art [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 190(4): 1525–52.
- [12] Xiang Q, Wang J, Qin P, et al. Effect of common bean seed exudates on growth, lipopolysaccharide production, and lipopolysaccharide transport gene expression of *Rhizobium anhuiense* [J]. *Can J Microbiol*, 2020, 66(3): 186–93.

Genetic characterization and potential transmission risk of novel Inc_{pGRT1} plasmids from *Pseudomonas* species

Li Xinyue^{1,2}, Wang Peng², Chen Fangzhou², Mu Xiaofei², Lu Xiuhui², He Jiaqi², Zheng Yali², Zhou Dongsheng^{1,2}, Yin Zhe²

(¹*School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)*

Abstract Objective To analyze the genome structure and genetic characteristics of Inc_{pGRT1} plasmids from *Pseudomonas*, and elucidate its potential transmission risk. **Methods** The genomic DNA of the clinical isolate 15420352 was extracted after purification and preservation of the strain, and then the whole genome was sequenced, and then the type of the plasmid was identified. Sequence annotation and comparison of the backbone region and the accessory modules were performed on all five same type sequenced plasmids, including one plasmid p420352 – strA in this study and four from GenBank. The plasmids were annotated by *RAST*, *Plasmidfinder*, *Blast*, *ResFinder*, and *ISfinder*. The ORFs of the plasmid were annotated and drug resistance genes were found. **Results** All five plasmids were classified as new Inc_{pGRT1} type plasmids. The Inc_{pGRT1} backbone genes or gene loci were in all five plasmids, and they contained an auxiliary replicon besides the primary Inc_{pGRT1} replicon. Five Inc_{pGRT1} plasmids carried at least three different accessory modules, including the *srp* region, the *msr* region, and a Tn5053 family transposon. Three resistance genes *strA*, *strB*, and *mer* were obtained in these plasmids, which were involved in resistance to two categories of antibiotics and heavy metals. We also found that these plasmids carried at least one virulence gene *msr* and five key transporters *srp*, *emrE*, *mod*, *phn*, and *lpt*, which could improve the environmental adaptability of the strains. **Conclusion** The Inc_{pGRT1} plasmids have become the important vector for the accumulation and spread of some drug resistance genes and virulence genes in *Pseudomonas*, and have improved the environmental adaptability of the strain.

Key words *Pseudomonas*; mobile element; plasmid; comparative genomics