

## 金黄色葡萄球菌RN1304及其变株的质粒消除与转导

陈小英 陈知本

(细菌耐药性研究组)

**摘要** 从一支保存多年的金黄色葡萄球菌 RN1304( $rec^-$ )的冷冻干燥菌种管中分离得黄色(Y)菌株及其白色(W)变株,它们都具有 $Tc^r$ 表型及一条质粒带。通过SDS处理,消除了它们的 $Tc^r$ 表型及质粒带,获得质粒消除株RN1304(Y-1)( $Tc^s$ )及RN1304(W-1)( $Tc^s$ )。将其作为受体菌,二株临床分离的金黄色葡萄球菌多剂耐药株(82022及85030)作为供体菌,通过葡萄球菌噬菌体80进行 $Tc^r$ 质粒的转导,证明二株质粒消除菌能在葡萄球菌的质粒转移中作为有效的受体菌,它们的转导频率为 $10^{-7}$ — $10^{-8}$ 。通过转导,同时鉴定了金黄色葡萄球菌82022及85030都具有 $Tc^r$ 质粒。质粒大小与原始RN1304株及已知金黄色葡萄球菌(22)的 $Tc^r$ 质粒相近似。

**关键词** 葡萄球菌; 耐药性质粒; 转导

金黄色葡萄球菌RN1304株是一株重组缺陷型菌( $rec^-$ )<sup>(1)</sup>。我们从一支保存多年的金黄色葡萄球菌RN1304冷冻干燥管中活化该菌株时发现其中约有半数呈白色菌落。经鉴定和纯化后的黄色(Y)及白色(W)菌株均具有 $Tc^r$ 表型,再经质粒提取及琼脂糖凝胶电泳证明均具有一条质粒带,大小相同,分别传代多次,耐药性、质粒带及色素特征稳定。为使该菌株成为更有效的遗传转移受体菌,以SDS消除其原有质粒带,再以该质粒消除菌为受体菌用转导证明二菌株接受供体质粒的有效性。

### 材料与 方法

#### 一、菌株与培养基

金黄色葡萄球菌RN1304(Y)( $Tc^r$ ); RN1304(W)( $Tc^r$ )系自上述菌株同一冷冻干燥管中分离而得的白色变株;金黄色葡萄球菌(22)为本组保存的已知多剂耐药菌株;金黄色葡萄球菌209P;金黄色葡萄球菌82022及85030,均为临床分离的多剂耐药菌。

BPY培养基<sup>(2)</sup>;脑心浸汁培养基(BHI)<sup>(3,4)</sup> 胨10g,氯化钠5g,葡萄糖2g,磷酸氢二钠2.5g,猪心浸汁200ml(新鲜猪心除去心头和脂肪,搅碎,称取100g,加蒸馏水至1000

ml),猪脑浸汁800ml(新鲜猪脑去除血管,称取200g,加蒸馏水至1000ml,50℃保温1h,煮沸15min,冷却后纱布过滤),pH7.2。

#### 二、质粒提取及电泳

方法参见文献<sup>(5)</sup>,采用微量法进行。

#### 三、质粒消除试验

方法参见文献<sup>(2)</sup>,所用SDS为Serva(进口分装)。

#### 四、转导试验<sup>(6,7)</sup>

1. 转导噬菌体的纯化及增殖 金黄色葡萄球菌噬菌体80用作转导噬菌体,采用双层平板法,应用BPY培养基,上层软琼脂内加入不同稀释度的噬菌体及供体菌BPY肉汤培养物。培养后挑取孤立噬斑进行纯化,连续二次,纯化后所得的噬菌体液保存于冰箱供增殖用。噬菌体的增殖采用同样的双层平板法,培养6h,选取噬斑融合的平板加入稀释液(10mmol/L Tris-10mmol/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , pH7.5)3ml,置冰箱内浸泡过夜,吸出稀释液,加氯仿2—3滴,经4000r/min离心20min,膜滤器除菌,效价达 $10^9$ — $10^{10}$ PFU/ml时用于转导。

2. 转导 受体菌培养于含 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  400 $\mu$ g/ml的BPY肉汤内,37℃静置培养

至对数期末期 (11 h), 菌数约为  $10^8$ – $10^9$  CFU/ml。取受体菌悬液及噬菌体等量混合, 于  $37^\circ\text{C}$  水浴内缓慢振摇 30 min, 加入 4 倍量冷 BHI 肉汤 (含  $0.01\text{ mol/L}$  枸橼酸钠) 以终止噬菌体的作用。4 000 r/min 离心 20 min, 菌体重悬于含  $0.01\text{ mol/L}$  枸橼酸钠的 BHI 内使恢复原始量, 再置于  $37^\circ\text{C}$  保温 4 h。取一定量以 L 棒涂布于含 Tc ( $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 及  $0.5\%$  枸橼酸钠的 BHI 平板上,  $37^\circ\text{C}$  培养 24–40 h 后计数转导子, 转导子数 / PFU 为转导频率。同时进行以下对照: 噬菌体无菌试验; 受体菌在含  $\text{Tc}^r$  及枸橼酸钠的 BHI 平板上的无菌试验; 受体菌在无药的枸橼酸钠 BHI 平板上的生长试验。

3. 转导子检测 所得转导子进行耐药性复测 (Tc  $5$ – $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ; Pc  $1$ – $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ; Km  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ; Gm  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ; SM  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), 再进行质粒检测。

## 结果与讨论

### 一、质粒消除试验

SDS 对原始菌株 RN1304 (Y) ( $\text{Tc}^r$ ) 及 RN1304 (W) ( $\text{Tc}^r$ ) 的 MIC 均为  $150\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。从 SDS 亚抑菌浓度 ( $90, 100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 及  $30\text{ }\mu\text{g/ml}$  管分离单菌落, 逐个点种于含 Tc ( $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 及无药的 BPY 平板上, 培养后选出  $\text{Tc}^s$  菌落, 再经耐药性复测。在耐药性筛选及复测时用原始菌株 (Y 及 W), 以金黄色葡萄球菌 (22) 及 209 P 作对照, 结果见表 1。

用 SDS 处理 Y 及 W 株,  $\text{Tc}^r$  表型都较易消除, W 株的消除率高于 Y 株。SDS 浓度为  $90\text{ }\mu\text{g/ml}$  时 W 株的  $\text{Tc}^r$  表型消除率达  $96.9\%$ ,  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  时消除率明显下降。证明最高消除率不一定获得于最高浓度。

从 Y 及 W 株的  $\text{Tc}^r$  消除株内各选四株, 测定 Tc 对它们的 MIC。结果 Tc 对原始 Y 及 W 株的 MIC 均为  $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ , 而对二者的  $\text{Tc}^r$  消除株均小于  $0.625\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。经质粒检测, 证明  $\text{Tc}^r$  株在  $\text{Tc}^r$  表型消除后质粒带也随之消除。说明原始菌株的质粒与  $\text{Tc}^r$  有关。Y 及 W 株所

Tab 1.  $\text{Tc}^r$  elimination of strains RN1304 (Y and W) by SDS

	SDS, $\mu\text{g/ml}$	Total no. of colonies	No. of $\text{Tc}^s$ colonies	%
RN1304(Y)	0	405	3	0.74
	30	712	5	0.70
	90	523	2	0.38
RN1304(W)	0	728	34	4.67
	30	517	51	9.67
	90	546	529	96.88
	100	240	2	0.83

带的质粒大小相同, 近似金黄色葡萄球菌 (22) 的  $\text{Tc}^r$  质粒, 质粒消除株进行琼脂糖凝胶电泳的结果见图 1。

据 Brock<sup>[8]</sup> 报道, 葡萄球菌的色素可由质粒编码产生。本实验证明 RN1304 株的色素产生与质粒无关。在以高浓度 SDS ( $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 处理 W 株时, 部分菌落出现黄色, 因而这种回复突变现象可能由染色体编码基因的突变或某些调节机制所致。所得的 Y 及 W 株的  $\text{Tc}^r$  消除株经二年来反复传代及  $-20^\circ\text{C}$  冷冻保藏, 其色素及对 Tc 的敏感性均稳定。

### 二、转导试验

以二株临床分离的金黄色葡萄球菌 (82022 及 85030) 为供体菌, RN1304 (Y-1) ( $\text{Tc}^s$ ) 及 RN1304 (W-1) ( $\text{Tc}^s$ ) 为受体菌, 葡萄球菌噬菌体 80 型为转导噬菌体, 进行转导。应用 Y-1 或 W-1 株为受体菌, 分别对 82022 及 85030 菌株  $\text{Tc}^r$  表型的转导, 结果见表 2, 其转导频率为  $10^{-7}$ – $10^{-8}$ 。

由表 2 可见, 在相似 MOI 条件下, 不同受体菌的转导频率相似。在利用不同 MOI 进行转导时, 合适的 MOI 约为  $0.1$ – $5$ , 高于  $5$ , 未能

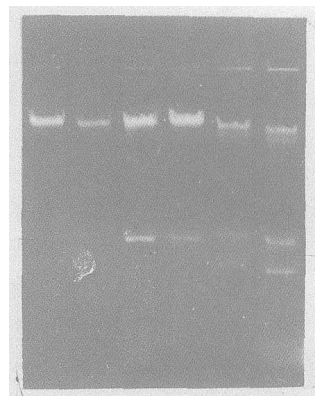


Fig 1. Agarose gel electrophoresis of the plasmid eliminated strains RN1304 (Y) ( $\text{Tc}^s$ ) and RN1304 (W) ( $\text{Tc}^s$ )

1. RN1304 (Y) ( $\text{Tc}^r$ );
2. RN1304 (W) ( $\text{Tc}^r$ );
3. RN1304 (Y) ( $\text{Tc}^s$ );
4. RN1304 (W) ( $\text{Tc}^s$ );
5. *S. aureus* (22).

Tab 2. Transduction of  $Tc^r$  in *S. aureus* from donor 82022 and 85030 to recipients RN 1304 (Y-1) and RN 1304 (W-1)

Donor	Recipient	Recipient, CFU /ml, $\times 10^{-8}$	MOI	No. of $Tc^r$ transducing units per ml	Transducing frequency, $\times 10^7$
82022	Y-1	3.02	31	313	0.33
		4.8	14.5	103.7	0.146
		6.4	3.7	177.5	0.748
		4.9	0.1	13.3	0.240
	W-1	8.0	4.7	126	0.335
		2.0	1.3	143	0.489
85030	Y-1	3.6	6.2	27.5	0.12
		5.2	0.5	40	1.3
	W-1	3.7	0.6	10	0.40
		5.9	0.5	63	2.0

提高转导频率, 低于0.1则所得的转导子过少, 对鉴定供体菌的质粒编码特征不利。曾在选择平板BHI中应用进口豚, 使受体菌数达 $10^9$  CFU/ml, MOI为13, 在此条件下的转导子数可达1490/ml, 但转导频率仍为 $10^{-8}$ 。因而, 提高受体菌数、噬菌体数以及改善选择平板的营养条件可以提高转导子数, 但转导频率未能提高。

据文献报道<sup>[9]</sup>, 葡萄球菌噬菌体的基因组大小近45 kb, 因而转导噬菌体可以携带多个小质粒基因组, 呈线性链环型存在, 当转移入受体菌后, 再分解为单体。在本实验中, 经琼脂糖凝胶电泳检测多个 $Tc^r$ 转导子的质粒DNA, 发现不论是用Y-1或是W-1作为受体菌, 它们经转导都只获得供体菌的一条小质粒带, 此质粒带与金黄色葡萄球菌(22)的一条质粒带有相似的迁移率。 $Tc^r$ 质粒转导的琼脂糖凝胶电泳结果见图2及图3。

随机选择54株的Y-1为受体菌而得的转导子(80/85030/Y-1), 测定它们对其它抗生素的共转导性。发现有53株带有 $Sm^r$ 共转导。Lyon<sup>[9]</sup>认为在转导噬菌体形成时,  $Sm^r$ 及 $Tc^r$ 质粒可以重组形成整合型, 在共转导入受体菌后又可解离或保持整合型。在本实验中所

得的 $Sm^r Tc^r$ 共转导子与单独 $Tc^r$ 转导子在琼脂糖凝胶电泳中的迁移率未有改变。是否共存于一个质粒中尚待进一步实验。

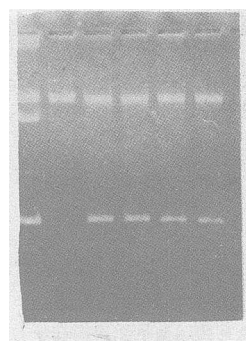


Fig 2. Agarose gel electrophoresis of  $Tc^r$  transducing units from donor strain 82022 to recipient RN 1304 (Y-1) ( $Tc^s$ ). 1. *S. aureus* 82022; 2. RN1304 (Y-1) ( $Tc^s$ ); 3-6. Transductant 80/82022/Y-1.

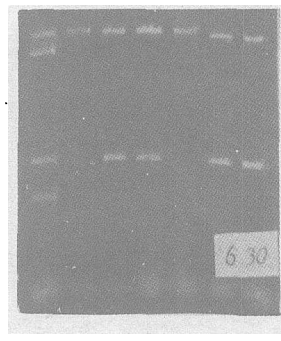


Fig 3. Agarose gel electrophoresis of  $Tc^r$  transducing units from donor strain 85030 to recipient RN1304 (W-1) ( $Tc^s$ ). 1. *S. aureus* 85030; 2. RN1304 (W-1) ( $Tc^s$ ); 3, 4. Transductant 80/85030/Y-1; 5. RN 1304 (W-1) ( $Tc^s$ ); 6, 7. Transductant 80/85030/W-1.

## 小 结

以质粒消除菌RN1304(Y-1)( $Tc^s$ )及RN1304(W-1)( $Tc^s$ )为受体菌进行转导, 它们对临床分离的金黄色葡萄球菌多耐药株(82022及85030) $Tc^r$ 表型的转导频率相似, 均为 $10^{-7} - 10^{-8}$ 。通过试验证明该二质粒消除株均可用于葡萄球菌质粒的遗传转移。白色株更可在实验中提供白色标记。

通过转导鉴定了金黄色葡萄球菌82022及85030均具有 $Tc^r$ 质粒, 与本实验所用的金黄色葡萄球菌(22)、RN1304株的 $Tc^r$ 质粒大小均近似。

致 谢 承福建医学院包幼迪教授惠赠金黄色葡萄球菌RN1304菌体。

## 参 考 文 献

- 1 Groves DJ. Interspecific relationships of antibiotic resistance in *Staphylococcus* sp.: isolation and comparison of plasmids determining tetracycline resistance in *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Can J Microbiol* 1979; 25 : 1468-75
- 2 陈小英. 大霉素对金黄色葡萄球菌抗生素耐药质粒的消除作用. 南京药学院学报 1985; 16 (2) : 48-52
- 3 阎俾云. 国外常用培养基. 开封: 开封市医学科学研究所, 1983 : 203
- 4 中国微生物菌种保藏管理委员会. 中国菌种目录. 北京: 轻工业出版社, 1983 : 203
- 5 陈小英, 冯瑞山, 陈知本. 金黄色葡萄球菌抗生素耐药质粒 DNA 的抽提及检测. 南京药学院学报 1985; 16 (2) : 53-8
- 6 Olson WC Jr, Parisi JT, Totten PA *et al*. Transduction of penicillinase production in *Staphylococcus epidermidis* and nature of the genetic determinant. *Can J Microbiol* 1979; 25 : 508-11
- 7 Poston SM, Palmer TJ. Transduction of penicillinase production and other antibiotic-resistance markers in *Staphylococcus epidermidis*. *J Gen Microbiol* 1977; 103 : 235-42
- 8 Brock TD, Smith DW, Madigan MT. *Biology of Microorganism*. New Jersey: Prentice-Hall, 1984 : 371
- 9 Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis. *Microbiol Rev* 1987; 51 (1) : 88-134

## PLASMID ELIMINATION AND TRANSDUCTION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RN1304 AND ITS ALBUS VARIANT

Chen Xiaoying and Chen Zhiben

*Research Group of Bacterial Drug Resistance*

*Staphylococcus aureus* RN1304(rec<sup>-</sup>)(Y) and its albus variant(W) were isolated in an old freeze dry ing culture. Both strains showed Tc<sup>r</sup> phenotype and a plasmid band in agarose gel electrophoresis. Strains of Tc<sup>r</sup> plasmid eliminated were obtained by treated Y and W strains described above with SDS. Two plasmid eliminated strains: RN1304(Y-1)(Tc<sup>s</sup>) and RN1304(W-1)(Tc<sup>s</sup>) were used as recipients, two multiple drug resistant strains of *S. aureus* 82022 and 85030 from clinical source as donors, and staphylococcal phage 80 as transducing phage, Tc<sup>r</sup> plasmid transduction was carried out. By transduction it was demonstrated that strains of Y-1 and W-1 were capable of serving as recipients in genetic transfer of staphylococcal plasmid. Their transduction frequency was similar, about  $10^7 - 10^8$ . By transduction the Tc<sup>r</sup> plasmids of *S. aureus* 82022 and 85030 were also identified.

**Key words** *Staphylococcus*; Drug resistant plasmid; Transduction

Projects supported by the National Science Found of China