

金黄色葡萄球菌 CCC 型及 OC 型质粒的检测

舒 泉¹ 陈小英 陈知本

(生物技术研究中心)

摘要 采用已报道的金黄色葡萄球菌质粒 DNA 的检测方法(简称 LL 法)。从1982年在南京地区临床分离的131株金黄色葡萄球菌中的125株(95.4%)中检出质粒,可分为21质粒谱。经单向及双向二步琼脂糖凝胶电泳法鉴别,按分子量共有16个 CCC 型质粒带($P_1 \sim P_{16}$)。用改良的 LL 法制备 *E. coli* V517 菌株质粒 DNA,建立了简便的测定金黄色葡萄球菌质粒 DNA 分子量的参考系统。结果表明:在本实验条件下, $P_1 \sim P_{16}$ 的分子量为 $1.42 \text{ Md} \sim 22.24 \pm 0.73 \text{ Md}$;以含有 $14.88, 2.66 \pm 0.06 \text{ Md}$ 质粒谱的菌株较常见,占总数的 25.2%; $2.66 \pm 0.06 \text{ Md}$ 的质粒最常见,在 73.3% 的菌株中检出。

关键词 金黄色葡萄球菌;质粒;二步琼脂糖凝胶电泳法

金黄色葡萄球菌是引起医院内感染的主要病原菌之一。目前已经证实其耐药性与耐药质粒有很大的关系^[1],由于耐药质粒的存在和传播,导致耐药菌株不断增加,给临床治疗带来了很大的麻烦^[2]。近十多年来,由于溶葡萄球菌素(Lysostaphin)的运用及多种微量、快速检测金黄色葡萄球菌质粒 DNA 方法的建立^[3~5],对于金黄色葡萄球菌耐药质粒的研究工作日益广泛、深入。

本文报道应用单向及双向二步电泳法(另文报道)检测1982年从南京地区临床分离的131株金黄色葡萄球菌所含 CCC 型及 OC 型质粒的结果以及各 CCC 型质粒的分子量。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

1.1.1 金黄色葡萄球菌 1982年从南京地区医院临床分离菌株131株,江苏省卫生防疫站徐凌云同志赠与。实验前进行了纯化和耐药性测定。

1.1.2 质粒分子量参考菌 *E. coli* V517株(含有已知分子量35.8, 4.8, 3.7, 3.4, 2.6, 2.0,

1.8和1.4 Md 的8个质粒),中国科学院微生物

研究所提供。

1.2 试剂与培养基

质粒检测的试剂参见文献^[3];LB 培养基:1%蛋白胨,0.5%酵母浸膏粉,0.5%氯化钠,pH 7.5。

1.3 质粒制备方法

1.3.1 金黄色葡萄球菌质粒 DNA 的制备 参见本室报道的方法^[3]。

1.3.2 *E. coli* V517 菌株质粒 DNA 的制备 少量新鲜斜面培养物在高渗条件下,经溶菌酶高渗液(溶菌酶终浓度为 7 mg/ml) 37°C, 45 min 破壁处理,其它步骤同 LL 法,即得 *E. coli* V517 菌株的质粒提取物。

1.4 质粒 DNA 电泳检测

将提取所得的 DNA 沉淀物溶于适量 TE 溶液^[3]中,取 25 μl 点样进行琼脂糖凝胶(含 EtBr 1 μg/ml 及 0.7% Agarose, 上海东海制药厂)电泳;电泳液 TBE^[6,7],电压 7.5 V/cm,时间 2.5 h. 用 0.05% 溴酚蓝甘油溶液作为前沿指示剂。在 253.7 nm 波长的紫外线下激发荧光,经红色滤色片,照相记录。

1.5 质粒构型鉴别

运用单向和双向二步琼脂糖凝胶电泳法进

行鉴别(另文报道)。

1.6 质粒DNA分子量计算

参照 Hansen 和 Olsen 报道的方法^[6],以 DNA 凝胶电泳区带照片测定各质粒带的电泳迁移距离。将质粒分子量参考菌株 *E. coli* V517 的最远一质粒区带的迁移距离定为 10, 并依次换算出其它各 CCC 型质粒带的相对迁移率(RM)。以相对迁移率的对数值(Log RM)为自变量, 分子量(MW)的对数值为因变量, 建立直线回归方程。便可计算出其相应的分子量。为使条件一致, 每次电泳时均有分子量参考质粒在同一凝胶板上进行。

2 结果

2.1 质粒谱

对受试的 131 株金黄色葡萄球菌均进行了质粒检测, 并对质粒谱中被染色体 DNA 带所掩蔽的质粒及质粒谱带的构型进行了单向及双向二步琼脂糖凝胶电泳法鉴别, 结果除 6 株菌未发

现质粒外, 其余 125 株均携带质粒, 分为 21 谱型(图 1)。以菌株 *S. aureus* 82139, *S. aureus* 82030, *S. aureus* 82090, *S. aureus* 82145, *S. aureus* 82107 和 *S. aureus* 82184 为代表的 C、D、J、K、O 和 T 质粒谱中均含有被染色体 DNA 带所掩蔽的质粒(P_{13} 和 P_{12}); 以菌株 *S. aureus* 82083, *S. aureus* 82046, *S. aureus* 82155, *S. aureus* 82119, *S. aureus* 82062, *S. aureus* 82031, *S. aureus* 82052, *S. aureus* 82097 和 *S. aureus* 82143 为代表的 G、H、I、M、P、Q、R、U 和 V 质粒谱中均有清晰的 OC 型质粒带, 这些 OC 型带经检测分别为 P_9 、 P_8 、 P_7 和 P_3 质粒在提取或保存过程中构型受破坏所致。从图 1 可知, 131 株金黄色葡萄球菌中检出迁移率不同的共有 16 个 CCC 型质粒(P_1 ~ P_{16})。各 CCC 型质粒在不同菌株中的分布情况如表 1 所示。从该表中看出, 74.8% 的菌株携带 2 个以上的质粒, 携带质粒最多的达 5 个, 以含有 P_{13} , P_9 质粒谱的菌株最多, 达 33 株, 占总数的 25.2%。

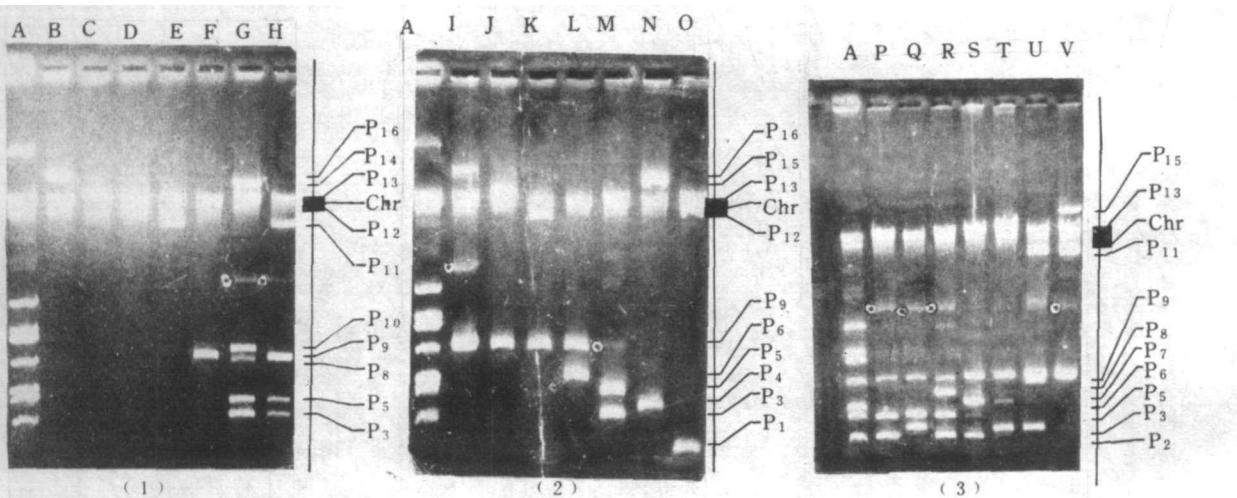


Fig 1. Plasmid profiles in 131 strains of *S. aureus* isolated in Nanjing in 1982
A: *E. coli* V517; B~V: *S. aureus* strains; O: OC band

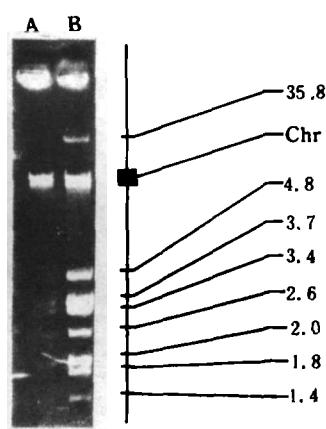
2.2 质粒分子量

2.2.1 分子量测定参考体系(*E. coli* V517)的建立 用本室报道的制备金黄色葡萄球菌质粒 DNA 的方法, 通过适当的改进; 省去溶葡萄球

菌素, 提高溶菌酶的浓度到终浓度为 7 mg/ml 时, 37℃ 作用 45 min, 结果较好。提取所得的 *E. coli* V517 DNA 经琼脂糖凝胶电泳后, 质粒区带清晰可辨(图 2(B))。图 2(A)所示为溶菌酶终浓

Tab 1. Plasmid profiles in 131 strains of *S. aureus*

No. of Plasmids	No. of strains, %	Strains	Plasmid contents
1	27 (20.6)	1 (0.8) 11 (8.4) 82047 82057 82061 82068 82075 82134 82127 82139 82010 82027 82028 1 (0.8) 7 (5.3) 7 (5.3)	82021 P ₁₆ 82028 P ₁₃ 82030 P ₁₂ 82179 82171 82168 82117 82079 82044 82158 P ₁₁ 82055 82137 82148 82150 82170 82144 82151 P ₉ 82088 82155 P ₁₄ P ₉
2	46 (35.1)	2 (1.5) 33 (25.2) 82103 82060 82077 82048 82176 82022 82014 82034 82039 82008 82138 82135 82123 82180 82108 82050 82169 82165 82161 82152 82124 82181 82090 82091 82071 82092 82174 82177 82113 82011 82043 82041 82006 3 (2.3) 2 (1.5) 2 (1.5) 3 (2.3) 1 (0.8)	82145 82146 82003 P ₁₂ P ₉ 82109 82018 P ₉ P ₆ 82119 82140 P ₉ P ₃ 82066 82081 82095 P ₁₃ P ₄ 82107 P ₁₂ P ₁
3	13 (9.9)	2 (1.5) 11 (8.4) 82121 82102 82037 82073 82036 82031 82032 82035 82110 82038 82063	82062 82058 P ₉ P ₅ P ₂ P ₉ P ₅ P ₃
4-5	39 (29.8)	1 (0.8) 2 (1.5) 7 (5.3) 15 (11.5) 82106 82184 82160 82183 82085 82002 82162 82154 82164 82157 82129 82101 82097 82099 82086 82144 82178 82020 82130 82125 82141 82122 2 (1.5) 3 (2.3) 9 (6.9)	82132 P ₉ P ₇ P ₆ P ₂ 82052 82115 P ₉ P ₇ P ₅ P ₂ P ₁₃ P ₉ P ₆ P ₂ P ₁₁ P ₉ P ₈ P ₃ 82143 82166 P ₁₂ P ₁ P ₉ P ₃ 82083 82033 82045 P ₁₄ P ₁₀ P ₈ P ₃ P ₁₁ P ₉ P ₈ P ₃ (none)
0	6 (4.6)	6 (4.6) 82136 82175 82054 82173 82142 82100 82040 82046 82067 82042 82025 82087 82093 82104 82111	

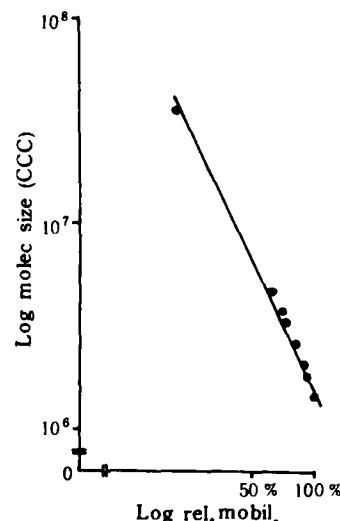
Fig 2. Plasmid profiles in *E. coli* V517 by LL method with modification

A: 1 mg/ml of Lysozyme; B: 7 mg/ml of Lysozyme

度为 1 mg/ml 时, 提取所得的质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱。各质粒相对迁移率的对数值与相应分子量的对数值呈密切负相关关系(见图 3)。

2.2.2 金黄色葡萄球菌质粒 DNA 的分子量精确量取

金黄色葡萄球菌各 CCC 型质粒带的

Fig 3. Standard curve of plasmids in *E. coli* V517
 $\text{LogMW} = -1.966 \text{ Log RM} + 8.181, (r = -0.9940)$

迁移距离, 换算出其相对迁移率, 代入各次电泳参考菌株 *E. coli* V517 质粒 DNA LogRM 与 LogMW 所建立的直线回归方程, 计算出各 CCC 型质粒的分子量, 表 2 所示为几次电泳所得的分子量范围值, 分子量为 2.66 ± 0.06 Md 的 P₉

质粒最为常见，在总数的 73.3% 菌株中检出，其次为 14.88 和 1.79±0.06 Md 的 P₁₅ 和 P₃ 质粒，分别在 38.9% 和 37.4% 的菌株中检出；分子量为 1.42 Md 的 P₁ 质粒较为少见，仅在 1 株菌中检出，其中被染色体 DNA 带所掩蔽的质粒的迁移率是估测的，因此，计算所得的分子量是大致值。

Tab 2. Molecular weights of plasmids in 131 strains of *S. aureus*

Plasmid designation	No. of strains	%	MW (Md) ^a , $\bar{x} \pm s$	n
P ₁₆	3	2.3	22.24±0.73	3
P ₁₅	5	3.8	20.29±0.86	4
P ₁₄	3	2.3	19.27±0.86	2
P ₁₃	51	38.9	14.88 ^b	6
P ₁₂	5	3.8	11.55 ^b	3
P ₁₁	33	25.2	10.22±0.35	5
P ₁₀	3	2.3	2.77±0.01	2
P ₉	96	73.3	2.66±0.06	6
P ₈	18	13.7	2.51±0.08	5
P ₇	3	2.3	2.33±0.03	3
P ₆	25	19.1	2.17±0.05	4
P ₅	30	22.9	1.97±0.04	6
P ₄	3	2.3	1.84	1
P ₃	49	37.4	1.79±0.06	6
P ₂	12	9.2	1.69±0.05	3
P ₁	1	0.8	1.42	1

^aTBE buffer; 7.5 V/cm; 0.7% Agarose, Shanghai;

^bPlasmid covered by chromosomal DNA band

3 讨论

用琼脂糖凝胶电泳检测细菌质粒时，要获得菌株所含有的准确质粒数目，必须排除非 CCC 型质粒带和鉴别质粒谱中是否存在被染色体 DNA 带所掩蔽的质粒。前述 21 型质粒谱中 P₁₂ 和 P₁₃ 被染色体 DNA 带所掩蔽。值得注意的是，在不同电泳条件下染色体 DNA 带与质粒 DNA 带的相对迁移位置不同，这样，在一种电泳条件下被掩蔽的质粒在另一种电泳条件下可能与染色体带分开。例如用 TE 电泳液^[3] 进行电泳 (4.2 V/cm, 4h) 即可直接地观察到图 1C、D 中被染色体掩蔽的质粒。

E. coli V517 菌株含有 8 个已知分子量的质

粒，是目前运用较广的测定质粒分子量的参考菌株，其质粒制备可用多种方法^[3,6,7]，但这些方法所用的试剂与提取流程均与制备金黄色葡萄球菌质粒 DNA 的方法有所不同^[3~5]，本实验利用改良 LL 法制备 *E. coli* V517 菌株的质粒 DNA，可与制备金黄色葡萄球菌质粒 DNA 同时进行，方法简化，不需加配试剂。值得注意的是，用琼脂糖凝胶电泳法测定质粒 DNA 的分子量时，各参考质粒的原始座标并非完全落在回归直线上（图 3）。因此不可避免导致测定值存在一定范围的误差。例如，从图 1(3) 可看出，P₂ 质粒与 *E. coli* V517 中 1.4 Md 质粒迁移率极接近，而通过回归方程计算所得 P₂ 的分子量却为 1.69±0.05 Md。另外，P₁ 质粒的迁移率明显大于 *E. coli* V517 中分子量最小的质粒的迁移率，由于它不在回归方程的线性范围内，故其分子量测定值 1.42 Md 存在进一步的误差。

参 考 文 献

- 1 Lacey RW. Antibiotic resistant plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. *Bacteriol Rev*, 1975; 39: 1.
- 2 刘振声. 医院内感染及其管理. 北京: 科学出版社, 1989.
- 3 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; 10(2): 53.
- 4 谈小云, 陈小英, 陈知本. 用溶菌酶-SDS 微量法提取金黄色葡萄球菌质粒 DNA. 中国药科大学学报, 1987; 18(1): 36.
- 5 Saha B, Saha D, Niyogi S, et al. A new method of plasmid DNA preparation by sucrose-mediated detergent lysis from *Escherichia coli* (gram-negative) and *staphylococcus aureus* (gram-positive). *Anal Biochem*, 1989; 176: 344.
- 6 Hansen JB and Olsen RH. Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P₂ incompatibility group plasmids pMG₁ and pMG₅. *J Bacteriol*, 1978; 135: 227.
- 7 Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, et al. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*, 1976; 127: 1529.

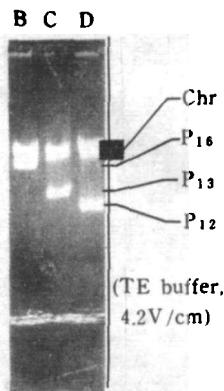


Fig 4. Plasmid profiles in *S. aureus* (the strains in slot B, C, D were similar with the strains in the slot B, C, D in Fig 1)

Detection of Staphylococcal Plasmids Involving CCC and OC Forms

Shu Quan, Chen Xiaoying and Chen Zhiben

Biological Research Centre

Studies showed that 125 of the total 131 strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Nanjing contained plasmid DNA, in which 74.8% of the strains demonstrated at least two plasmid DNA bands in the profiles by the LL method. Two-step agarose gel electrophoresis was employed to detect the CCC and OC plasmid DNA bands. Molecular weights of the CCC plasmid DNA bands were estimated by comparison with those of reference plasmids extracteed from *E. coli* V517 using the LL method with modification. Twenty-one plasmid profiles in the strains of *Staphylococcus aureus* were found, in which there were 16 CCC plasmid DNA bands ranging from 1.42 Md to 22.24±0.73 Md. The 2.66±0.06 Md plasmid DNA was detected from 73.3% of the strains. Strains containing 14.88 and 2.66±0.06 Md plasmids were the most encountered (25.2%).

Key words *Staphylococcus aureus*; Plasmid; Agarose gel electrophoresis

应用固定化细胞酶工程技术生产 L-天冬氨酸技术成果通过鉴定

中国药科大学生物化学教研室研究应用固定化细胞酶工程技术生产 L-天冬氨酸获得成功。该工艺的小试技术在中国药科大学制药厂进行了中试放大，并制定了适合连续化工业生产的工艺路线及工艺操作规程。目前已形成了年产 100 吨 L-天冬氨酸的规模。1992 年 3 月 20 日国家医药管理局主持召开《应用固定化细胞酶工程技术生产 L-天冬氨酸》成果鉴定会，与会专家一致认为该工艺是一项先进的新型生物技术，整个成果数据可靠、工艺合理、经济效益高。该工艺具有稳定、操作简便、成品质量高、原材料国产化等优点，且投资小、成本低、见效快。已达到国际上同类工艺的技术水平，属国内领先。利用酶工程技术生产 L-天冬氨酸使其生产成本大大下降，必将产生较大的经济效益和社会效益。固定化细胞酶技术的日趋完善为生物技术的产业化开辟了很好的途径。