

细菌抗药机制研究的新进展

洪孟民

(中国科学院上海植物生理研究所微生物室, 上海)

近几十年来, 抗菌素在细菌性疾病的防治上收到了显著的效果。但是在每种新抗菌素应用不久之后, 就会遇到致病菌抗药的问题。有些抗药细菌不但抗药水平高, 而且对多种抗菌素均有抗性。这种情况不但严重影响了抗菌素的疗效, 而且也额外地增加了抗菌素的消耗量。因此研究细菌对药物抗性的原因, 寻找解决的方法, 是科研工作者的重要课题。

两类不同的抗药细菌

在实验室中, 如果将敏感的细菌涂布在含有适当浓度的某种抗菌素的平皿上, 经过保温后, 往往会出现少数抗性菌落, 这种抗性菌株主要是由于在染色体上发生了突变而形成的。例如大肠杆菌抗链霉素的染色体突变, 经研究表明, 突变的位置在染色体基因图上接近 64 分钟的地方^[1], 其结果使细胞内的核糖体 30S 亚基中的 S_{12} (或称 P_{10}) 蛋白质的一个氨基酸发生了改变^[2], 以致链霉素不能象原来那样再与核糖体结合而抑制蛋白质的生物合成, 所以细菌对链霉素就有了抗药性。染色体自发突变的频率一般很低, 在临床上很少碰到这类抗药细菌。

目前在临床上特别受到人们重视的是另一类抗药细菌。这是日本细菌工作者首先注意到的。他们在痢疾的流行病学研究中一再观察到: (1) 从同一流行源的病人中可分离出对药物完全敏感的痢疾杆菌、而从另一些病人中分离出的则是同一血清型的对多种药物有抗性的痢疾杆菌; (2) 有些病人既带有敏感的痢疾杆菌, 也带有同一血清型的抗药性痢疾杆菌; (3) 一些病人只用过一种药物, 但他们所带的痢疾

杆菌能对多种抗菌素具有抗性; (4) 大部分带有多重药物抗性的痢疾杆菌的病人, 其肠道中也有对多种药物有抗性的大肠杆菌^[3]。这些现象使他们推测, 这种抗药菌株与染色体突变产生的抗性菌株不同。经过研究证明, 细菌的多重药物抗性可以在细菌之间转移, 不但在试管中, 而且在狗与小白鼠的体内也证明了这一点。但是抗药细菌的细胞与敏感细菌的细胞的接触, 对抗性转移是必要的。更重要的是, 从遗传学的研究表明, 多重药物抗性是被一种称为抗性因子 (简称 R 因子) 的遗传因子所携带的。它是临床上抗药细菌产生抗药的主要原因。R 因子的发现, 对深入研究细菌对药物抗性的机制起了很大的推动作用^[3,4]。

R 因子的遗传学研究

一、R 因子是一种质体 (或称质粒)^[5]

R 因子有两个主要的遗传特性, 一是它能够通过细胞与细胞间的接触, 由抗性菌株转移到敏感菌株, 而使后者获得药物抗性性状。当 R 因子转移到带有几种染色体标记的大肠杆菌 K12 的 F^- (不带 F 因子) 的菌株后, 获得 R 因子的 F^- 菌株还可将 R 因子再转移到 K12 的其它 F^- 菌株中。而受体菌株的染色体标记通常不被改变。这说明转移不依赖于细菌的致育性因子 (F 因子) 的作用。同时也表明 R 因子与细菌染色体基因之间没有连锁关系。从而在遗传上阐明了 R 因子在细胞中是与染色体分开的遗传结构。R 因子的另一个特性是有自主复制的功能。在细胞分裂时, R 因子也同步地进行复制而使子

细胞也带有R因子。当接合转移时,由于R因子具有复制功能,除了使受体菌获得R因子外,还保证了给体细胞不失去R因子。所以,从R因子能接合转移、与染色体不连锁、有自主复制的功能以及象F因子一样,能被吖啶类染料所消除等遗传上的特点,表明R因子是一种染色体外的遗传因子,是质体中的一种。由于致病菌细胞中带了具有质体性质的R因子,加上临床上抗菌素的应用起了选择的作用,因此为抗药性致病菌的传播提供了有利的条件,使得临床上的多重药物抗性菌株越来越多^[5,6]。

二、R因子转移中性纤毛的作用

电镜观察表明,带R因子的大肠杆菌细胞表面有一种称为性纤毛的结构,这在不带R因子的细胞中是没有的。实验证明,性纤毛是R因子的产物。根据形态,抗原结构与吸附专一噬菌体的能力不同,性纤毛可分成“F型”、“I型”及普通型三种^[5,6]。关于性纤毛的功能,有人认为它是R因子转移的通道,也有报道说它是双螺旋的结构,认为不可能起通道的作用,它的作用可能是使两个细胞固定在一起以利于R因子转移。

三、R因子的寄主

在很多种细菌中,例如变形杆菌、绿脓杆菌、痢疾杆菌、沙门氏菌、克氏杆菌、欧氏植病杆菌以及鼠疫杆菌、霍乱弧菌等抗药性菌株细胞中,均证明有R因子存在。R因子还可以在不同种的菌株间进行转移。这也是R因子在各种菌株中如此广泛存在的原因^[7]。金黄色葡萄球菌也存在有抗药性的质体,但不能进行接合转移,可被噬菌体所转导。

四、R因子的遗传结构

(一) 渡边模型^[8]

在研究plac噬菌体转导大肠杆菌K12中的 ϕ ⁺R 222因子(Su、Sm、Cm、Tc)*时,渡边等观察到所有的药物抗性在大部分转导子中都被同时转导到受体菌株,在一小部分转导子中只能

转导Tc抗性或Su、Sm、Cm的抗性,极少数接受了Sm、Cm与Tc抗性,但没有Su抗性,而且大部分的药物抗性转导子可以将它们的抗性标记通过接合,转移给另外的受体细菌。而在研究P₂₂噬菌体转导鼠伤寒沙门氏菌LT-2的R 222因子时,观察到Tc抗性总是从其它抗性中分离出来,而Su、Sm、Cm抗性则常被同时转导。在少数转导子中只有Su与Sm抗性被同时转导,而且大部分抗性转导子不能通过接合将其抗性转移到受体菌株中。渡边根据上述转导中的分离现象及R因子的其它性质,认为R因子是由一个抗性转移因子(RTF)与药物抗性遗传因子(r-遗传因子)直接联结而成的一个整体。药物抗性遗传因子因抗性转移因子的功能在细菌中转移扩散^[9]。

(二) Anderson 模型

这是Anderson对鼠伤寒沙门氏菌29AST菌株中可转移的抗性遗传因子Amp^{**}, Sm, Su, Tc进行遗传连锁分析研究后提出来的^[10]。他认为一个可转移的因子是由两种在遗传上可区别的成份,即转移单位(简称 Δ)与各抗性遗传因子所组成。在细胞内它们是分开存在的。当接合转移时,给体细胞只转移其中某些性状到受体细胞,例如某些受体细胞只接受了Amp抗性遗传因子,另一些受体细胞接受了Sm抗性遗传因子,但是它们都是不能转移的。还有一些细胞并没有获得抗性遗传因子,但当与带有非转移性的Amp抗性遗传因子或Sm抗性遗传因子的细胞一起保温时,就能有效地使这些非转移性抗性遗传因子转移到受体菌株中去。这表明没有抗性遗传因子但有转移功能的细胞带有转移单位 Δ 。因此Anderson认为原始菌株鼠伤寒沙门氏菌29AST中带有几个不同的质体,即有转移功能的 Δ 、非转移性的S(链霉素抗性遗传因子),非转移性的A(氨基青霉素抗性遗传因子)以及 Δ 与T(四环素抗性遗传因子)结合在一起的 Δ -T质体。当A或S与 Δ 或与 Δ -T共存于一

* Su表示磺胺, Sm表示链霉素, Cm表示氯霉素, Tc表示四环素。

** Amp表示氨基青霉素。

个细胞中时, A或S也可转移到受体细胞中去。

对于上述两种结构模型,有人认为是两种不同类型的R因子,也有人认为无原则上的差别,只是寄主细胞不同,所以对R因子的结构可能有某种影响。

五、R因子中与转移有关的基因

美国^[11]与西德^[12]的一些实验室分别从带Fgal与R100-1及Flac质体的大肠杆菌中分离了许多因突变而失去转移功能的tra-变种,并用遗传互补的方法进行与转移有关的基因的数目与排列次序的研究。他们分别鉴定出六个与十二个与转移有关的顺反子^[11,12]。其中traA、traB、traC、traE、traF、traH、traJ、traK、traL变种及一部分traG变种,均对所有的专一性噬菌体有抗性,而且不形成F性纤毛,表明这些顺反子与合成性纤毛有关。traI, traD以及一部分traG变种对所有专一性噬菌体敏感,仍合成性纤毛。推测这些顺反子的产物和与转移有关的DNA代谢有关。traS是行使表面排斥功能的顺反子,是双功能的或者是两个顺反子。还认为traJ与转移的控制有关,是整个行使转移功能的操纵子的控制基因。这些顺反子都是聚集在RTF部分。用核酸异源双链分析表明,有转移功能的F因子,Col因子及R因子三种质体,这部分的核苷酸顺序都是高度同源的。这些研究结果反映了质体的转移包括着很多复杂精细的生化反应。同时对R因子的来源与演化也提供了有意义的资料。

R因子的分子生物学特性

一、R因子是一种染色体外的DNA

用去污剂及酚抽提法从奇异变形杆菌细胞中提取DNA并进行CsCl密度梯度离心,在离心达到平衡后的DNA显示图上,可看到染色体DNA的吸收峰。如果用带R因子的奇异变形杆菌做材料,照上法分析,则在DNA显示图上除了密度为1.698克/厘米³的染色体DNA峰外,还有一个密度为1.704—1.718克/厘米³

的卫星DNA小峰。如果用消除质体的药物将细菌中所带的R因子消除后,则它的DNA显示图上也失去了上述卫星DNA小峰。这表明R因子DNA在细胞内确实是与染色体DNA分开存在的,是一种染色体外的遗传因子^[13]。

二、R因子的分子量与构型

经密度梯度超速离心而与染色体DNA分开后的R因子DNA样品,经适当处理后可以在电镜下测量它们的分子量与观察它们分子形状。分子量可以根据相同条件下DNA分子量与长度之比计算出来^[14]。在不同的细菌生长期,R因子DNA分子形状有些差别。常见的是共价闭合环状DNA(简称ccc型)及开放型环状(简称oc型)的混合物。有的成超卷曲状(supercoiled)^[14]。还报道有连环状(catenate)的结构。即ccc型分子之间相互串成一条连环。有些是二聚体,有些是多聚体。

三、核苷酸的颠倒顺序

利用DNA异源双链技术分析R因子DNA核苷酸顺序的结构时,发现R因子DNA分子中有颠倒重复的核苷酸顺序存在。当将这种DNA进行单链退火时,在此颠倒重复的顺序之间由于碱基间的互补,便形成了一段双链区。遗传学上的研究证明这些顺序具有插入到质体或染色体中某些部位的功能,并称为插入序列(简称IS元素)。在R因子中已鉴定出两种插入序列,即IS1及IS2,它们分别为800个及1300个核苷酸对^[15]。在共组入(cointegrate)型的R因子中,证明在RTF与r-遗传定子之间有插入序列存在。这可以解释R因子中可能存在的可逆地解离成RTF与r-遗传定子两部分的机制。插入序列还在形成多聚状态的r-遗传定子中起重要作用。因此抗药性菌株中高度抗性菌株的形成与R因子的插入序列的作用有一定的关系。插入序列还能同某些与插入功能无关的其他基因结合而形成可易位的序列,称为易位子(简称Tn),例如TnA,它带有氨基青霉素的抗性基因,共2470个碱基对,两端为800个核苷酸的IS1。易

位子不但能将其所带的基因从一个质体转到另一个质体,还可从质体转到染色体上。而且它们的易位不依赖于 *recA* 基因的功能。IS 与 Tn 的发现正引起分子遗传学工作者的很大注意,它与 R 因子的解离、聚合、高度抗性的形成均有密切的关系。

四、R 因子拷贝数与抗性水平

由于 R 因子与染色体 DNA 的分子量已能准确测定,因此根据超速离心后测得的 R 因子 DNA 与染色体 DNA 含量之比,就可以计算出每个细胞中 R 因子拷贝数。根据对一些 R 因子测定结果,可以看出,有些 R 因子在每个细胞内的拷贝数较少,为 2—3 个,有的 R 因子的拷贝数较多,在 10—40 之间。拷贝数的多少,可能与 R 因子的复制的调节控制有关。一般称拷贝数少的 R 因子的复制为严密型复制,称拷贝数多的 R 因子的复制为松弛型复制。

Round 的报道指出^[16,17],带 R 因子 NR1 的奇异变形杆菌生长在无药的肉汤中时,在超速离心的 DNA 显示图上除了染色体 DNA 峰外只有一条密度为 1.712 克/厘米³的 DNA 峰;当细菌由无药的肉汤中移种到含氯霉素 100 微克/毫升的肉汤中并经过若干世代后,密度为 1.712 克/厘米³的 DNA 峰逐渐减低,而密度为 1.718 克/厘米³的 DNA 峰开始出现并逐渐增加。与此相反,如果细菌先在含氯霉素 100 微克/毫升的肉汤中培养到静止期后期(此时 1.718 克/厘米³ DNA 占细胞染色体 DNA 的 60%)再移种无药的肉汤中若干世代,则可看到 1.718 克/厘米³峰逐渐下降而 1.712 克/厘米³峰逐渐增加(约占染色体 DNA 的 6%)。他根据上述现象,认为 1.712 克/厘米³峰为 RTF DNA,而 1.718 克/厘米³峰为 r-遗传因子 DNA。当细胞生长在含药物的培养基中时, R 因子解离成 RTF 与 r-遗传因子,而且 r-遗传因子拷贝数增多,成多聚结构,因此 1.718 克/厘米³峰增加。而转到不含药物的培养基后,多聚结构的 r-遗传因子解离成单个的 r-遗传因子,并逐渐被繁殖的细胞所稀释,因此只有 1.712 克/厘米³的峰。实验还指出 R 因子(带

氯霉素抗性遗传因子)拷贝数增高时,细菌细胞中的氯霉素乙酰转移酶的活力也相应增加。从上述结果可以看出,至少在这个菌株中,细菌抗药水平的高低与细胞合成钝化酶的多少及 r-遗传因子的拷贝数有关。而拷贝数除受 DNA 复制的调节机制控制外,还与细菌生长时抗菌素存在与否有一定的关系。

细菌抗药的生化机制^[18,19]

根据上述资料可以知道,大多数抗药细菌都带有由具有转移功能的 RTF 与对各种抗菌素产生抗性的各种 r-遗传因子所组成的 R 因子。对于各种 r-遗传因子来说,弄清它们通过什么途径使细胞获得抗药性,即阐明细菌的抗药性机制是很主要的一环。根据大量的研究表明,对于临床上常用的几种抗菌素,按细菌抗药的生化机制不同,大致可以分为三类。

一、细胞膜发生改变

由于细菌的细胞膜的结构发生改变,使得原来能进入细胞的抗菌素不能再进入。属于这类的有磺胺、四环素以及部分菌株对氯霉素的抗性。据报道,这类抗性大多由 R 因子决定的,但细胞膜发生了什么改变知道得很少。

二、产生使细菌核糖体结构发生改变的酶

从临床分离的某些金黄色葡萄球菌及链球菌对红霉素等大环内酯抗菌素有抗药性。这些菌株在低浓度红霉素的诱导下,产生甲基化酶,它能专一地使 23 S 的核糖体 r-RNA 的腺嘌呤分子的第 6 位 N 原子甲基化。使红霉素不能与核糖体结合以抑制蛋白质的合成,细菌因而产生抗药性。

三、产生使抗菌素结构改变的酶

细菌产生一种改变抗菌素结构的酶,使其失去抗菌活力,现分述如下。

(一) 氯霉素

对氯霉素具有抗性的菌株能产生氯霉素乙酰转移酶(简称 CAT)。它在乙酰辅酶 A 的存

在下,使氯霉素发生乙酰化,成为无抗菌活力的3-乙酰氯霉素与1,3-乙酰氯霉素。但是也有报道表明,在不带R因子的菌株中也有少量的CAT的酶活力。

(二) β -内酰胺类抗菌素(青霉素与先锋霉素)

除了金黄色葡萄球菌对甲氧基苯基青霉素的抗性是由于细胞透性改变外,其它大多是由于产生了 β -内酰胺酶。它的作用是使青霉素或先锋霉素分子中的 β -内酰胺水解,使其失去抗菌活力。革兰氏染色阳性细菌中的 β -内酰胺酶是胞外酶、诱导性的。而革兰氏染色阴性细菌中的 β -内酰胺酶则是胞内酶、本质性的。在肠道杆菌氨苄青霉素抗药性细菌的不同菌株中,已鉴定出在性质上有某些差异的八种 β -内酰胺酶。

(三) 氨基糖苷类抗菌素

到目前为止,已从大肠杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、奇异变形杆菌及克氏肺炎菌等抗药性菌株中鉴定出八种能使链霉素、新霉素、卡那霉素和庆大霉素等失去抗菌活力的酶。它们分别把ATP或乙酰辅酶A的磷酸基团、腺苷酸基团或乙酰基团转到这些抗菌素分子上,成为磷酸化、腺苷酸化或乙酰化的抗菌素衍生物(表1)。这些酶能钝化几种结构相近的抗菌素,有的抗菌素能被几种钝化酶所钝化^[19]。也有些抗菌素被乙酰化后,仍有部分抗菌活力。有些抗药性绿脓杆菌的细胞中测不出这八种酶的活力。因此,还可能还有其他类型的钝化酶存在。

由于阐明了一些细菌对某些抗菌素抗性的生化机制,这就为改造抗菌素的化学结构,合成

表1 抗药性细菌中氨基糖苷与氨基环醇类抗菌素的钝化酶

钝化反应类型	钝化酶		抗药性细菌	被钝化的抗菌素	抗菌素结构改变的部位
	I	II			
乙酰化反应	氨基糖苷-6'-乙酰转移酶[AAC(6'')]	卡那霉素乙酰转移酶(KAcT)	大肠杆菌 绿脓杆菌	卡那霉素、氨基羟丁基卡那霉素、庆他霉素-C ₂ 、紫苏霉素	氨基己糖中的6-氨基被乙酰化
	氨基糖苷-3-乙酰转移酶[AAC(3)]	庆他霉素乙酰转移酶I(GAcT-I)	大肠杆菌 绿脓杆菌 克氏肺炎菌	庆他霉素、紫苏霉素	氨基己糖的2-氨基被乙酰化
	氨基糖苷-2'-乙酰转移酶[AAC(2'')]	庆他霉素乙酰转移酶II(GAcT-II)	普罗威登氏细菌	庆他霉素	氨基己糖的2-氨基被乙酰化
磷酸化反应	氨基糖苷-3"-磷酸转移酶[APH(3'')]	链霉素磷酸转移酶(SPT)	大肠杆菌 金黄色葡萄球菌 绿脓杆菌	链霉素	N-甲基-L-葡萄糖胺的3'-羟基被磷酸化
	氨基糖苷-3'-磷酸转移酶[APH(3')]	新霉素-卡那霉素磷酸转移酶II(NPT-II)	大肠杆菌 绿脓杆菌 金黄色葡萄球菌	新霉素、卡那霉素、丁氨基霉素(NTPH)	氨基己糖的3'-羟基被磷酸化
	氨基糖苷-5"-磷酸转移酶[APH(5'')]	青紫霉素磷酸转移酶(LvPT)	大肠杆菌 绿脓杆菌	青紫霉素、核糖霉素	核糖部分的5"-羧基磷酸化
腺苷酸化反应	氨基糖苷-氨基环醇3"-腺苷酸转移酶[AAD(3'')]	链霉素-放线壮观素腺苷酸转移酶(SAdT)	大肠杆菌	链霉素、放线壮观素	D-threomethyl amino alcohol的羧基被腺苷酸化
	氨基糖苷-2"-核苷酸转移酶[ANT(2'')]	庆他霉素腺苷转移酶(GAdT)	大肠杆菌 克氏肺炎菌	卡那霉素、庆他霉素、托普霉素	氨基己糖的2-羧基被腺苷酸化

或半合成对各种类型的抗性细菌有效的新抗菌素提供了可靠的依据。

R因子的来源问题

曾经报道过,在未曾用过抗菌素的地区的土壤中,分出了带R因子的细菌。最近又有人报道在一些抗菌素产生菌的细胞中测出了类似

于抗药性细菌中使氨基糖苷类抗菌素乙酰化或磷酸化的酶^[18](表2)。虽然这些放线菌在产生抗菌素与钝化酶的活力之间的关系不是完全一致的,也未证明有腺苷酸转移酶的存在,但这一发现对于抗药因子的来源问题有一定的参考意义。

表 2 抗菌素产生菌中的氨基糖苷钝化酶

菌 株	产生的抗菌素	钝 化 酶	钝化的部位
<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 10971		链霉素磷酸转移酶	3''—OH
<i>S. griseus</i> MA-8	链霉素	链霉素磷酸转移酶	—
<i>S. griseus</i> HUT6037	链霉素	链霉素磷酸转移酶	6—OH
<i>S. bikiniensis</i> NRRL B-1049	链霉素	链霉素磷酸转移酶	—
<i>S. spectabilis</i> UC2012	放线壮观素	卡那霉素/巴他霉素乙酰转移酶	2'—NH ₂
<i>S. flavopersicus</i> NRRL B-2820		链霉素磷酸转移酶	—
<i>S. fradiae</i> UC2046	新霉素	新霉素磷酸转移酶	3'—OH
<i>S. albogriseolus</i> NRRL B-1305	新霉素	新霉素磷酸转移酶	3'—OH
<i>S. rimosus</i> [forme <i>paromomycinus</i> NRRL2455]	巴龙霉素	新霉素磷酸转移酶 卡那霉素/巴他霉素乙酰转移酶	2'—NH ₂
<i>S. ribosidificus</i> ATCC 21294	核糖霉素	新霉素磷酸转移酶 卡那霉素/巴他霉素乙酰转移酶	3'—OH 6'—NH ₂
<i>S. kanamyceticus</i> ATCC 12854	卡那霉素	卡那霉素/巴他霉素乙酰转移酶	6''—NH ₂
<i>S. tenebrae</i>	托普霉素	新霉素/卡那霉素乙酰转移酶	2'—NH ₂
<i>Micromonospora purpurea</i> NRRL 2953	巴他霉素	新霉素磷酸转移酶	—
<i>Bacillus circulans</i> NRRL B-3312	丁胺菌素	新霉素磷酸转移酶	3'—OH

解决细菌抗药性问题的研究情况

一、R 因子的消除

据报道,吡啶橙、利福平、阿的平、十二烷基磺酸钠、溴化乙锭等化合物均能在不同程度上消除抗药性菌株中的 R 因子。其中有些化合物的消除机理是由于它们能穿插在双螺旋 DNA 的碱基对之间而影响 DNA 的复制。但由于毒性问题,或者由于消除的频率还不够高等原因,这些化合物还未能临床上应用^[20]。

二、抗菌素的结构改造及不被酶水解的新抗菌素的筛选

对某些类型的抗药性细菌有效的新的半合成抗菌素,如氨基羟丁基卡那霉素(又称 BBK8)及双脱氧卡那霉素 B(简称 DKB)是根据抗药性的生化机制而进行抗菌素结构改造取得成绩的很好例子^[19,21]。预期还会有更多的根据抗药机制而设计出来的对抗药性细菌有效的半合成抗菌素出现。

三、酶的抑制剂

例如从放线菌中筛选出的 β -内酰胺酶的抑制剂^[22],以及从青霉素结构改造中发现的 β -内酰胺酶的抑制剂等研究,表明抑制剂也是值得

重视的一种方法,值得加强这方面的研究工作。

四、其它

对抗药性菌株所致疾病有治疗作用的中草药、噬菌体与抗血清的研究等也是很有希望的途径。

综上所述,可以看出细菌抗药性的研究,无论在 R 因子的遗传性质、分子生物学特性,抗药性的生化机制以及解决细菌抗药性问题的具体方法等方面,都取得了一定的进展。这些进展的取得与其它学科,特别是细菌质体,病毒 DNA 分子的结构等方面研究的进展有密切的关系。同时药物抗性质体的研究也推动了其它学科,如质体遗传,遗传工程学方面的前进。但是细菌抗药性问题的解决还需做许多深入的研究,这在生物学的基础理论与解决医药上所遇到的实际问题方面都具有重大的意义。

参 考 文 献

- [1] Davies, J. et al.: *Ann. Rev. Genet.*, 6:203, 1972.
- [2] Nomura, M.: *Bacteriol. Rev.*, 34:228, 1970.
- [3] Watanabe, T.: *ibid*, 27:87, 1963.
- [4] Watanabe, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 81:669, 1961.
- [5] Meynell, G. G.: *Bacterial Plasmids; Conjugation, Colicinogeny and Transmissible Drug-resistance*, Macmillan, London, 1972.
- [6] Watanabe, T.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 56:43, 1971.

- [7] 范云六: 遗传学报, 2: 173, 1975.
- [8] Watanabe, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 82:202, 1961.
- [9] Watanabe, T.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 182:126, 1971.
- [10] Anderson, E. S. et al.: *Nature*, 206:579, 1965.
- [11] Ohtsubo, E. et al.: *Genetics*, 64:173, 1970.
- [12] Achtmen, M. and R. Helmuth: The F Factor Carries an Operon of More than 15×10^6 Daltons Coding for Deoxyribonucleic Acid Transfer and Surface Exclusion, *Microbiology-1974* (ed. by Schlessinger, D.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1975, pp. 95—103.
- [13] Clowes, R. C.: *Bacteriol. Rev.*, 36:316, 1972.
- [14] Cohen, S. N. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 182: 172, 1971.
- [15] Cohen, S. N.: *Nature*, 263: 731, 1976.
- [16] Rownd, R. H. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 182:188, 1971.
- [17] Rownd, R. H., D. Perlman and N. Goto: Structure and Replication of R-factor Deoxyribonucleic Acid in *Proteus mirabilis*, *Microbiology-1974* (ed. by Schlessinger, D.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1975, pp. 76—94.
- [18] Dowding, J. and J. Davies: Mechanisms and Origins of Plasmid-Determined Antibiotic Resistance, *ibid*, pp. 179—186.
- [19] Benveniste, R. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 42: 471, 1973.
- [20] Hahn, F. E.: *Science*, 182:295, 1971.
- [21] Kawaguchi, H. et al.: *J. Antibiot. (Tokyo)*, 25: 695, 1972.
- [22] Iwai, Y. et al.: *Antimicro. Agents Chemother.*, 4:222, 1973.