

弗氏痢疾杆菌和大肠杆菌多重抗药因子的 接合转移和抗药因子的消除

王孙仑 吴永强 陈剑民*

(中国科学院上海植物生理研究所,上海)

病原菌多重抗药性的研究在医学上有重要意义。发生抗药性突变的频率一般比较低,而通过抗药因子接合转移获得抗药性的频率较高,而且常常是多重抗药因子同时转移。这种转移可在种间和属间进行。抗药性的遗传因子是由染色体外的质体携带的^[1,2]。

我们用痢疾杆菌的抗药性菌株进行了多重抗药因子接合转移和抗药因子消除的试验,结

果如下。

材料和方法

一、材料

(一) 菌株

1. 弗氏痢疾杆菌 (*Shigella flexneri*)2 号、8

* 本工作由沈善炯教授指导, 得到上海华山医院刘裕昆等医生的热情帮助。

号和 11 号菌株(以下简称 S2、S8 和 S11), 是从上海华山医院的痢疾患者分离得到。

2. 大肠杆菌(*Escherichia coli*) 2 号和 4 号菌株(以下简称 E2, E4), 是从上海华山医院的尿路感染患者分离得到。大肠杆菌 B5 号菌株(以下简称 B5)是从上海儿科医院的婴儿腹泻患者分离得到。

3. 用作接合转移试验的受体菌株有大肠杆菌 K12 菌株, 大肠杆菌 3UV150 菌株(简称 3UV150); 还有经紫外线和硫酸二乙酯诱变处理后获得的、抗 50 微克/毫升巴龙霉素的、大肠杆菌 K12 的突变菌株 K12Pm^r。

(二) 培养基

1. 肉汤培养基(克): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, NaCl 5; 水 1 升, pH 7.2—7.4。固体培养基加 2% 琼脂。

2. M—G 合成培养基(克): NH₄Cl 0.1, MgSO₄ 0.013, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.78, KH₂PO₄ 0.3, 乳糖或葡萄糖 0.4 (分别灭菌), 水 100 毫升, pH 6.8。

(三) 抗菌素

金霉素(Au)、氯霉素(Cm)、青霉素(Pc)、链霉素(Sm)、磺胺(Su)、四环素(TC)、巴龙霉素(Pm)、卡那霉素(Ka)、新霉素(Ne)、多粘菌素(Po)和 α -氨基青霉素 BRL1341(Am)。

二、方法

(一) 抗药因子接合转移

供体菌和给体菌分别接种在 5 毫升肉汤培养基中, 37°C 振荡培养 6 小时后等体积混合, 37°C 静置过夜, 取 0.2 毫升涂布平皿, 分离出接合转移子, 两次单菌分离后测定对抗菌素的敏感性。

痢疾杆菌接合转移实验中, 痢疾杆菌和受体菌大肠杆菌培养液以 10:1 的体积比混合, 37°C 静置 2 小时后, 3000 转/分离心 15 分钟, 收集菌体, 用生理盐水制成菌悬液, 取 0.4 毫升涂布平皿。

(二) 青霉素酶的检测

1. 用八叠球菌检验青霉素酶, 参照 Knox 的

方法^[3]。

2. 检测有胞外青霉素酶菌落的方法, 对 Perret^[4] 和 Andxcon^[5] 的方法作了改进。在皿底铺了肉汤琼脂, 接种后 37°C 培养 17 小时, 加上 5 毫升中层琼脂覆盖, 中层琼脂是 0.3 克可溶性淀粉和 0.6 克琼脂粉溶于 0.2M、pH7.4 的磷酸缓冲液 60 毫升中, 在溶解后加入 16.7 毫克/毫升青霉素 G 配成。琼脂凝固后在 37°C 保温 1 小时, 用含 12 毫克/毫升碘-4% 碘化钾的溶液显色。有青霉素酶的菌落四周出现透明白圈, 背景为蓝紫色。也可在倾注中层琼脂前, 影印复制两套相同的平皿, 一套供显色检测, 一套供表型分析时挑取菌落。

(三) 抗药因子的消除实验

用肉汤培养基配制吡啶黄或三乙烯亚胺苯醌溶液, pH 为 7.6, 灭菌备用。在肉汤培养基中培养 6 小时的菌液 (10⁹/毫升), 用生理盐水稀释后 (含 10⁴/毫升), 取 1 滴加入上述化学消除剂溶液中, 37°C 振荡培养 24 小时, 取菌液涂布平皿, 同时用不以化学药物处理的菌液作对照, 用上述方法检测有胞外青霉素酶的菌落。

(四) 抗菌素敏感试验

用纸片法和双倍稀释法。用后一方法时, Cm、Au、Tc、Sm 用肉汤稀释, Su 用 M—G 合成培养基稀释。接种量 10⁴—10⁵/毫升左右, 37°C 振荡培养 24 小时观察结果。

结果与讨论

一、S2 和 S11 菌株的 Au、Cm、Sm、Pc 抗药因子向大肠杆菌 K12 菌株的接合转移

1. 以 S2 菌株为供体菌, K12 菌株为受体菌: 由于 S2 菌株对 Au 和 Cm 有抗性, 但不利用乳糖; K12 菌株对 Au 和 Cm 敏感, 但可发酵乳糖。因此在含有 25 微克/毫升 Cm, 以乳糖为唯一碳源的 M—G 合成培养基上, 可选出接合转移子, S2 和 K12 均不生长。接合转移子大肠杆菌 K12 (RS2) 菌株的抗药性及碳源利用性状的鉴定结果见表 1。

由表 1 看出, 接合转移子 K12 (RS2) 菌株

表 1 接合转移子大肠杆菌 K12(RS2) 的性状*

抑菌圈直径 菌株	性状 抗菌素	抗药性					乳糖发酵
		Au	Cm	Ka	Po	Am (1微克/每片纸)	
		(10微克/每片纸)					
S2 (供体菌)		0	0	14	14	16	不发酵
K12 (受体菌)		10	19	16	12	7	发 酵
K12(RS2) (接合转移子)		0	0	16	12	7	发 酵

* 用纸片法测定。

是受体菌通过接合转移获得了供体菌的 Au、Cm 抗药因子而形成的。

S2 和 S8 菌株都对 Sm 有抗性；但抗药水平不同。S2 在含 20 微克/毫升 Sm 的培养基中可以生长，在含 200 微克/毫升 Sm 的培养基中不生长；S8 在含 100 微克/毫升 Sm 时却能够生长。混合培养 S2、S8 和大肠杆菌 K12 菌株，所得接合转移子 K12(RS2) 仅能在低浓度 Sm 中生长，而 K12(RS8) 却能对高浓度 Sm 有抗性。这不仅说明 Sm 抗性因子可以接合转移，而且抗药水平也可以同样转移。

2. 已知供体菌 S11 菌株对 Pc 有抗性，能合成青霉素酶，它在八叠球菌影印复制皿上出现直径为 7 毫米左右的生长圈。受体菌 K12 菌在此时不形成生长圈。两株菌发生接合转移后，接合转移子 K12(RS11) 也会形成生长圈。这说明 S11 的抗药因子转移给了 K12 菌株，因而受体菌可产生胞外青霉素酶。

为了了解上述接合转移现象的普遍性，用 113 株抗药性痢疾杆菌对大肠杆菌进行了接合转移试验，发现有 95 株(占 84%) 可进行接合转移。在自临床上分离的 123 株痢疾杆菌中，有 115 株对三种以上抗菌素有抗药性，由此可知研究病原菌的接合转移，对了解和控制它们具有重要意义。

二、大肠杆菌 E2、E4 和 B5 菌株抗药因子的接合转移

1. 供体菌 E2 和 E4 对 Cm 和 Au 有抗药性，受体菌是大肠杆菌 K12Pm^r 菌株。用含 50 微克/毫升 Pm 和 10 微克/毫升 Cm 的肉汤平板选出接合转移子，并测定其抗药性。结果见表 2。由表 2 可见，接合转移子 K12(RE2) 和 K12

表 2 E2 和 E4 菌株的抗药因子向 K12 Pm^r 的接合转移*

抑菌圈直径(毫米) 菌株	抗 菌 素	Cm	Au	Sm	Ka	Pc	Am (1微克/片)
		(10 微克/片)					
		供 体 菌	E2	0	0	18	15
	E4	0	0	8	14	12	0
受 体 菌 K12		18	13	0	0	16	0
接 合 转 移 子	K12(RE2)	0	0	0	0	15	0
	K12(RE4)	0	0	0	0	16	0

* 用纸片法测定。

(RE4) 同时具有受体菌和供体菌的抗药性。

2. 用 B5 菌株 (Lac⁻Sm^rCm^rTc^rSu^r)* 作供体菌、用 3UV150 菌株 (F⁻Sm^rHis⁻Ile⁻Val⁻)* 作受体菌，用加有 0.4% 乳糖和组氨酸、异亮氨酸和缬氨酸各 10 微克/毫升，并分别加入 25 微克/毫升的 Au、Cm 或 Su。从这些培养基中各分离出 15 株接合转移子测定它们对抗菌素的敏感

性，结果见表 3。由表中可知，对 Au、Cm 和 Su 的抗药性因子是同时转移的。45 株接合转移子的抗药水平一致，并与供体菌相同。

* 这些符号表示遗传标记：Lac⁻——不发酵乳糖；Sm^rCm^rTc^rSu^r——对链霉素、氯霉素、四环素和磺胺的抗药性；F⁻——没有致育因子，His⁻Ile⁻Val⁻——组氨酸、异亮氨酸、缬氨酸缺陷型。

表3 抗菌素对接合转移子 3UV150(RB5) 的最低抑菌浓度

菌 株	培养基中加人的抗菌素	最低抑菌浓度(微克/毫升)		
		金霉素	氯霉素	磺胺
接合转移子	金霉素	>50	>250	>500
	氯霉素	>50	>250	>500
	磺胺	>50	>250	>500
3UV150(受体菌)		<1	<8	<1
B5(供体菌)		>50	>250	>500

三、用化学药物消除 S11 菌株的青霉素酶质体

S11 菌株用 25 微克/毫升吡啶黄, 在 37°C 处理 24 小时, 有 32% 的菌株丢失了青霉素酶质体, 不再产生青霉素酶。大肠杆菌 K12 菌株经同样处理后, 不丧失青霉素酶。

由经吡啶黄处理过的菌落中任取 10 个分离纯化, 经检测, 5 株菌中消除了青霉素酶质体, 5 株未被消除。对它们进行表型分析的结

表 4 10株经吡啶黄处理的 S11 菌株的表型分析

结 果 菌 株	分 析 项 目	抗菌素敏感试验*						乳糖发酵	复合血清凝集反应
		Cm	Sm	Tc	Nc	Pm	Am		
SA ₁		23	13	14	12	11	16	-	+**
SA ₂		23	13	16	12	12	17	-	+
SA ₃		24	13	17	11	11	17	-	+
SA ₄		24	14	16	11	11	17	-	+
SA ₅		23	14	16	12	10	18	-	+
SAR ₁		0	0	0	13	11	0	-	+
SAR ₂		0	0	0	13	12	0	-	+
SAR ₃		0	0	0	14	12	0	-	+
SAR ₄		0	0	0	13	12	0	-	+
SAR ₅		0	0	0	14	12	0	-	+
对 照	S11	0	0	0	12	11	0	-	+
	K12	15	17	11	14	13	16	+	-

* 用纸片法测定, 以抑菌圈直径的毫米数表示。Cm、Sm、Tc、Nc、Pm 均为 10 微克/片, Am 为 5 微克/片。

** “+”表示阳性反应, “-”表示阴性反应。

果见表 4。由表 4 可见, 青霉素酶质体被消除后, 该菌对 Cm、Sm、Tc 和 Am 的抗药性全部丧失。这说明菌株的这些抗药性状有共同被消除的情况, 而由染色体控制的乳糖发酵和血清凝集反应等性状, 与抗药性质体存在与否无关。但青霉素酶质体与对新霉素和巴龙霉素的抗性因子不能一起被消除。

此外, 用 3.2 微克/毫升的三乙烯胺苯醌处理 S11 菌株, 有 6% 的菌中青霉素酶质体被消除。

参 考 文 献

- [1] Watanabe T.: *Scientific American*, 217: 6, 19—27, 1967.
- [2] Watanabe T.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 176: 371—384, 1971.
- [3] Knor R., et al.: *Nature*, 191: 926—927, 1961.
- [4] Perret C. J.: *Nature*, 174: 1012—1013, 1954.
- [5] Anderson S. S., et al.: *Nature*, 206: 4984, 579—583, 1965.