

嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) R551-3 四环素抗性消除的研究

马鹏娟, 刘中华, 戴亦军, 袁 生

(江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏省生物多样性和生物技术重点实验室,
南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 嗜麦芽寡养单胞菌可共代谢降解烟碱类农药吡虫啉, 并且对多种抗生素具有抗性. 本文通过电穿孔法消除了该菌的四环素抗性, 获得了四环素敏感型菌株 R551-3^{Tet^r}, 可以用作遗传转化系统的受体菌, 能被转化吸收遗传载体质粒 pJB866H: *ndhSL*, 构成一对很好的嗜麦芽寡养单胞菌遗传转化系统. 同时 HPLC 结果表明所获得的四环素敏感型菌株羟基化吡虫啉的活性并未发生改变, 为进一步开展敲除和回补共代谢途径关键酶的研究工作奠定了基础.

[关键词] 嗜麦芽寡养单胞菌, 吡虫啉, 电穿孔, 抗性消除, 四环素

[中图分类号] Q 819 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010) 01-0084-06

Study on Elimination of the Tetracycline Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3

Ma Pengjuan, Liu Zhonghua, Dai Yijun, Yuan Sheng

(Jiangsu Provincial Engineering and Technology Research Center for Microbiology Resource Industrialization, Jiangsu Key Laboratory of
Biodiversity and Biotechnology, School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract *Stenotrophomonas maltophilia* can degrade neonicotinoid insecticide imidacloprid through co-metabolism and exhibits multiple antibiotic resistance. Through electroporation we obtained a R551-3 mutant which lost tetracycline resistance. Besides, the tetracycline resistant plasmid pJB866H: *ndhSL* was successfully transformed into the R551-3^{Tet^r} strain. Therefore, the R551-3^{Tet^r} strain can be used as a recipient to construct a *Stenotrophomonas maltophilia* genetic transformation system. The tetracycline resistance lost mutant keeps the ability of hydroxylating imidacloprid. Based on this mutant, the following gene knockout and recovery experiments can be carried out.

Key words *Stenotrophomonas maltophilia*, imidacloprid, electroporation, resistance elimination, tetracycline

微生物共代谢在难降解有机物的生物降解中发挥了重要作用. 本实验室先前分别报道了嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 可共代谢降解烟碱类农药吡虫啉 (MI)^[1-3]、啉虫咪 (AAP)^[4]、噻虫啉 (THI)^[5]. 但我们在预实验中发现, 添加不同的共代谢基质到嗜麦芽寡养单胞菌转化液中, 会产生不同的吡虫啉代谢产物, 说明共代谢基质的不同会导致菌体启动不同的吡虫啉降解途径. 因而需要进一步采用分子生物学方法敲除共代谢途径的某些关键酶, 构建嗜麦芽寡养单胞菌突变株, 以研究不同的共代谢基质进入的代谢途径及其与不同的吡虫啉降解产物的关系, 从而阐明共代谢基质调控吡虫啉代谢途径的分子机制. 为此需要建立一套研究嗜麦芽寡养单胞菌 (*S. maltophilia*) 的遗传转化系统. 但我们研究发现, 嗜麦芽寡养单胞菌 R551-3 菌株具有氨基青霉素、卡那霉素、四环素、安普霉素和链霉素^[6]等多种常用抗生素的抗性, 因而难以采用上述抗生素抗性作为遗传转化的筛选标记. 已知细菌的抗生素抗性可以由细菌的染色

收稿日期: 2009-10-14

基金项目: 国家自然科学基金 (30970040)、江苏省高校自然科学基金 (09KJB180003)、江苏省高校自然科学重大基础研究 (06KJA21016).

通讯联系人: 袁 生, 教授, 博士生导师, 研究方向: 微生物转化. E-mail: yuansheng@njnu.edu.cn

体基因决定^[7], 或者由其所带有的内源性质粒所引起^[8-9]. 若能通过适当方法将嗜麦芽寡养单胞菌 (*S. maltophilia*) 所含的上述抗生素抗性基因消除, 则可有效建立一种方便的抗生素抗性的遗传筛选标记, 为进一步开展基因的敲除和回补实验研究奠定基础. 目前已报道的细菌抗生素抗性消除的方法主要有质粒消除法^[10-11]、分子生物学方法^[12]等. 其中质粒消除法又包括十二烷基硫酸钠 (SDS) 法^[13-14]、紫外法^[14-15]、高温法^[16]、高温-SDS 法^[17-18]等. 由于结构及生理上的独特性, 不同菌株的抗性消除机制各不相同, 目前尚没有普遍适用的抗性消除方法. 本文先后尝试采用十二烷基硫酸钠 (SDS) 法、紫外法、高温法、高温-SDS 法等消除嗜麦芽寡养单胞菌 (*S. maltophilia*) 的抗生素抗性, 均未获得成功. 最后发现采用电穿孔法^[10-19, 20], 可成功地消除该菌的四环素抗性, 为进一步开展参与吡虫啉共代谢的关键基因的敲除和回补实验研究提供了可供选用的抗性遗传标记, 详细结果报道如下.

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及引物

表 1 菌株、质粒及引物
Table 1 Strains plasmid and primers

类别	名称	特点	来源
菌株	嗜麦芽寡养单胞菌 (<i>S. maltophilia</i>) R551-3 菌株	具有氨苄青霉素、卡那霉素、四环素等多种抗性 降解吡虫啉	Daniel van der Lelie 博士提供 (Brookhaven National Laboratory, USA)
	嗜麦芽寡养单胞菌 (<i>S. maltophilia</i>) R551-3 ^{Tet^r} 菌株	丢失四环素抗性 降解吡虫啉	本文
质粒	pJB864H:: <i>ndhSL</i>	Tet ^r , 12.3 kb 以 KTO 1-F 和 KTO 1-S 为 引物可扩增出 0.5 kb 片段	文献 ^[21]
引物	16S-up	5'-AACTGAA GAGTTTGATCCTGG CTC-3'	上海生工合成
	16S-down	5'-TAGGTTACCTGTGTTACGACTT-3'	
	KTO 1-F	5'-GGGGA GCTCCCATG GCTATG CAAA CAA CCATCTCCCTGC-3'	上海生工合成
	KTO 1-S	5'-CCCAAG CTTTCTAGATCATGG CTTTCTCCG GGTCTCG-3'	

1.2 R551-3 内源性质粒的提取及鉴定

根据文献^[22]按碱裂解法进行质粒提取. 质粒 DNA 在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳鉴定, 电泳缓冲液为 1 ×TAE, 用美国 BD-RAD 凝胶成像系统拍照保存.

1.3 抗生素抗性检测

选取 4 种不同的抗生素: 氨苄青霉素、卡那霉素、四环素、氯霉素, 在 LB 培养基中加入不同浓度的这 4 种抗生素, 铺成平板, 考察菌株在平板上的生长情况, 以确定是否对抗生素存在抗性.

1.4 电击细胞的制备及电穿孔方法

电击细胞的制备及电穿孔方法参考文献^[19], 冻存管菌种于 LB 平板上划单菌落, 30℃ 培养, 24 h 从平板上挑取单菌落到种子培养瓶 (100 mL 锥形瓶装 30 mL 培养基), 30℃, 220 r/min, 16 h 再以 1/100 接种量接种到 LB 培养基中 (500 mL 锥形瓶装 100 mL 培养基), 30℃, 220 r/min, 培养至 A₆₀₀ = 0.6 时, 冰浴菌体 15 min, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体. 用预冷的无菌水洗 3 次, 再用预冷的 10% 的甘油洗 1 次, 收集菌体悬浮于 10% 的甘油中, 50 μL/管分装, 保存于 -80℃. 取保存于 -80℃ 的 50 μL/管的电击细胞置于冰上 10 min, 然后将 50 μL 的电击细胞置于预冷的电转杯中 (电极狭缝为 0.2 cm), 电击条件为 2.5 kV · cm⁻¹, 时间为 5.2 ms, 10~15 个脉冲. 电击后加入 800 μL LB 培养基, 恢复培养 1 h 稀释至 10⁻⁵ 同时涂无抗 LB 平板及含氨苄青霉素、卡那霉素、四环素、氯霉素的 LB 平板 (便于计算消除率), 30℃ 培养, 24 h

1.5 平板影印筛选抗性消除菌株

挑取 LB 平板上长出的单克隆均匀点至另一 LB 平板上, 30℃ 培养, 12 h, 然后将该平板分别影印至含氨苄青霉素、卡那霉素、四环素、氯霉素的 LB 平板上, 30℃ 培养, 12 h, 挑选抗性消除菌株. 若影印后在抗性平板上不形成菌落, 则挑取纯化该单菌落再次影印验证.

1.6 16S rDNA 序列测定分析

试剂盒提取 R551-3^{Tet^r} 菌株的基因组, 用细菌 16S 通用引物扩增 16S rDNA, 测序, 在 NCBI 数据库中比

对.

1. 7 抗性质粒的电转化及菌落 PCR 鉴定

将 R551-3^{T^{cr}} 菌株按照方法 1. 4 制备电转化感受态, 向抗性消除的菌株中电转化入含该抗性的质粒, 通过菌落 PCR 鉴定阳性克隆.

1. 8 羟基化吡虫啉活性的检测^[1, 3, 4]

从平板上挑取单菌落到种子培养瓶 (100 mL 锥形瓶装 30 mL 培养基), 30℃, 220 r/m in, 16 h 再以 1 / 100 接种量接种到 LB 培养基中 (100 mL 锥形瓶装 30 mL 培养基), 30℃, 220 r/m in, 20 h 取 2 mL 菌悬液, 于 8 000 r/m in 离心 5 m in 用 0. 2 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 8. 0) 洗涤后, 分别悬浮于 0. 5 g/L M I 2% 蔗糖和 33. 3 g/L 琥珀酸的上述磷酸盐缓冲液中, 于 30℃, 220 r/m in 振荡转化 48 h 取样前, 用无菌水补足蒸发水分后取样, 样品于 8 000 r/m in 离心 10 m in 上清稀释相应倍数后 HPLC 分析. HPLC 分析采用 Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司生产); 色谱柱为 Agilent HC-C18 柱 (250 × 4. 6 μm, 5 μm); 进样体积为 20 μL; 柱温为 30℃; 检测波长为 269 nm. 流动相 A 为经 0. 22 μm 微孔过滤膜过滤的双蒸水, B 为乙腈, A: B = 75: 25 流速为 1 mL / m in HPLC 数据在 Agilent Chem Station 上进行分析.

2 实验结果

2. 1 R551-3 菌株对抗生素的抗性

对野生 R551-3 菌株抗生素抗性的检测结果如表 2 所示, 该菌株对氨苄青霉素、卡那霉素、四环素均不敏感, 而对氯霉素敏感.

表 2 R551-3 菌株对抗生素的抗性
Table 2 The antibiotic resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3

抗生素	氨苄青霉素	卡那霉素	四环素	氯霉素
浓度 /(μg/mL)	100	30	15	34
R551-3 菌株	++	++	++	--

注: ++ 生长良好; -- 不生长.

2. 2 R551-3 菌株抗生素抗性的消除

按方法 1. 4 将电击后的细胞稀释至 10⁻⁵, 分别涂布在不含抗生素 LB 平板、含氨苄青霉素 LB 平板、含卡那霉素 LB 平板和含四环素 LB 平板上, 30℃ 培养 24 h 菌落计数表明, 在含氨苄青霉素 LB 平板和含卡那霉素 LB 平板上形成的单菌落数较多, 与不含抗生素 LB 平板上出现的单菌落数基本一致, 而在含四环素 LB 平板上形成的单菌落数很少. 说明电击处理使大部分菌体细胞失去了四环素抗性, 因而不能在含有四环素的 LB 平板上生长并形成菌落. 其中: 无抗 LB 平板上单菌落个数为 824, 四环素平板单菌落个数为 91, 抗性 (质粒) 消除率为 89. 0% .

将在不含抗生素 LB 平板上长出的嗜麦芽寡养单胞菌 R551-3 菌落接种到新的不含抗生素 LB 平板, 30℃ 培养 12 h 再按方法 1. 5 影印至四环素 LB 平板上, 30℃ 培养 12 h 通过比对将能够在不含抗生素 LB 平板上生长、而不能在含四环素 LB 平板上生长的敏感菌落挑出, 经纯化鉴定, 最终获得四环素抗性消除的 R551-3^{T^{cr}} 菌株.

2. 3 R551-3^{T^{cr}} 菌株的分子鉴定

提取 R551-3^{T^{cr}} 菌株基因组, PCR 扩增其 16S rDNA, 在 NCBI 数据库中比对, 比对结果为: 四环素抗性消除后的 R551-3 菌株与野生 R551-3 菌株 16S rDNA 的相似性为 100%, 证明四环素抗性消除后的敏感菌株仍为嗜麦芽寡养单胞菌 R551-3 菌株.

2. 4 R551-3^{T^{cr}} 菌株的内源性质粒分析

对 R551-3 菌株进行质粒抽提分析, 确定 R551-3 菌株至少含有一个大小约为 8 kb 的质粒. 对四环素抗性消除后的敏感菌株 R551-3^{T^{cr}} 进行质粒抽提分析, 发现大小约为 8 kb 的质粒仍然存在 (图 1).

2. 5 R551-3^{T^{cr}} 菌株的四环素抗性质粒的转化

向四环素敏感菌株 R551-3^{T^{cr}} 中电转化入含四环素抗性的假单胞菌质粒 pJB866H: *ndhSL*, 可使敏感性菌株重新变为抗性菌株, 在含四环素 LB 平板上生长形成抗性菌落. 挑取抗性菌落, 经菌落 PCR 扩增证

实该抗性菌落含有抗性基因,而敏感型菌株 R551-3^{Tcr-} 则不含有四环素抗性基因(图 2),说明敏感菌株 R551-3^{Tcr-} 可以用作遗传转化系统的受体菌,能很好接受原先用作假单胞菌的遗传载体质粒 pJB866H: : *ndhSL*, 构成一对很好的嗜麦芽寡养单胞菌遗传转化系统。

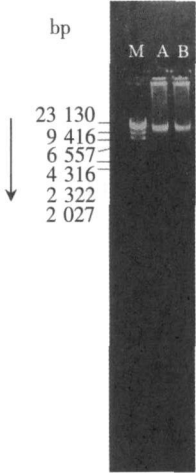


图 1 野生型 R551-3 菌株和四环素敏感型菌株 R551-3^{Tcr-} 内源性质粒分析

Fig. 1 Analysis of plasmids from wild R551-3 strain and tetracycline sensitive R551-3^{Tcr-} strain

M. λ -Hind III digest DNA Marker; A. 野生型 R551-3 菌株的质粒提取物分析; B. 四环素敏感型 R551-3^{Tcr-} 菌株的质粒提取物分析

2. 6 R551-3^{Tcr-} 菌株羟基化吡虫啉活性的检测

对四环素抗性消除后的敏感菌株 R551-3^{Tcr-} 进行了测定,结果表明,四环素抗性消除后,菌株 R551-3^{Tcr-} 仍然保留其羟基化吡虫啉的活性,和野生型 R551-3 的羟基化吡虫啉的活性相比基本没有改变(图 3)。

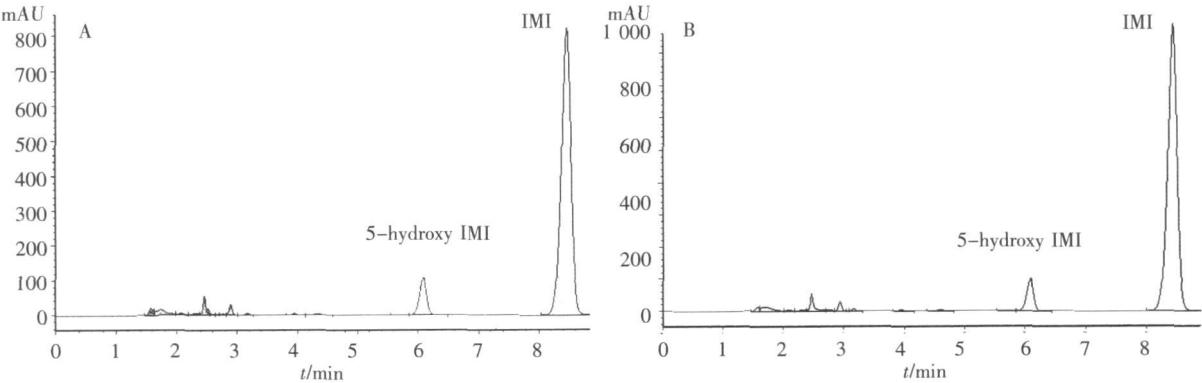


图 3 R551-3 和 R551-3^{Tcr-} 羟基化吡虫啉的 HPLC 图谱

Fig 3 HPLC spectrum of metabolism of IMI by R551-3 strain and R551-3^{Tcr-} strain

mAU 光检测的吸收值; A. 野生型 R551-3 菌株羟基化吡虫啉的 HPLC 分析; B 敏感型 R551-3^{Tcr-} 菌株羟基化吡虫啉的 HPLC 分析

3 讨论

有报道指出很多细菌的抗生素抗性是由内源性质粒引起的^[14 17, 18],电穿孔法原理在于高压电脉冲可使细胞膜和细胞壁产生通道使质粒流出,故可以用于质粒(抗性)的消除,已报道的使用电穿孔法的质粒(抗性)消除都是基于这一原理^[10 19]. 本文通过电穿孔法,消除了 R551-3 菌株的四环素抗性,但是大小约为 8 kb 的质粒仍然存在,推测 R551-3 菌株四环素抗性的消除可能并不是通过消除携带抗四环素抗性基因的质粒而实现的. Zhang 等报道指出,嗜麦芽寡养单胞菌对多种抗生素表现出的抗性^[23-25],可能与该菌外膜渗透屏障、外排系统、各种酶类及迅速突变的靶位有关^[24 26-28],这些基因并不一定由质粒携带^[29],也可以由基因组编码^[26]. 其中多重外排泵系统是嗜麦芽寡养单胞菌获得多重耐药性的最重要原因,已发现

的外排泵系统有 Sm dDEF 系统和 Sm eABC 系统, 而 Sm dDEF 泵可外排喹诺酮类、四环素、氯霉素和大环内酯类^[26-28,30]. Zhang 等分别敲除了 *S. maltophilia* ULA-511 的 sm eE 基因和 sm eF 基因, 发现敲除后 ULA-511 对四环素的敏感性分别降低了 4 倍和 2 倍^[26]. 已知高压电脉冲可以引起基因的突变或沉默^[30-31], 因而推测我们的实验结果很可能是由于高压电脉冲引起了 R551-3 菌株 sm dDEF 基因的沉默或突变, 所以导致了四环素抗性表型的减弱或消失.

四环素抗性质粒的转化及阳性克隆抗性基因分析表明, 本研究所获得的四环素敏感型菌株 R551-3^{T^{cr}} 可以用作遗传转化系统的受体菌, 能很好接受原先用于假单胞菌的、含四环素抗性基因的遗传载体质粒 pJB866H:: *ndhSL*^[21], 构成一对很好的嗜麦芽寡养单胞菌遗传转化系统. 同时 HPLC 结果表明所获得的四环素敏感型菌株羟基化吡虫啉的活性并未发生改变, 这就为下一步通过基因敲除研究嗜麦芽寡养单胞菌对农药吡虫啉代谢途径的调控提供了方便的抗性筛选标记.

[参考文献]

- [1] Dai Y J, Chen T, Ge F, et al. Enhanced hydroxylation of imidacloprid by *Stenotrophomonas maltophilia* upon addition of sucrose[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74(5): 995-1000.
- [2] Dai Y J, Yuan S, Ge F, et al. Microbial hydroxylation of imidacloprid for the synthesis of highly insecticidal olefin imidacloprid[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 71(6): 927-934.
- [3] 杨顺瑛, 姬微微, 戴亦军, 等. 嗜麦芽寡养单胞菌菌株间羟基化烟碱类杀虫剂吡虫啉的机制差异[J]. 自然科学进展, 2008, 18(10): 1163-1168.
- [4] Chen T, Dai Y J, Ding J F, et al. N-demethylation of neonicotinoid insecticide acetamiprid by bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 1.1788[J]. Biodegradation, 2008, 19(5): 651-658.
- [5] Zhao Y J, Dai Y J, Yu C G, et al. Hydroxylation of thiacloprid by bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC1.1788[J]. Biodegradation, 2009, 20(6): 761-768.
- [6] 耿毅, 汪开毓, 陈德芳, 等. 嗜麦芽寡养单胞菌研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(5): 28-31.
- [7] Lescat M, Calteau A, Hoede C, et al. A module located at a chromosomal integration hot spot is responsible for the multidrug resistance of a reference strain from *Escherichia coli* clonal group A[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(6): 2283-2288.
- [8] Sammillan A, Escudero J A, Gutiérrez B, et al. Multiresistance in *Pasteurella multocida* is mediated by coexistence of small plasmids[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(8): 3399-3404.
- [9] Blanco M, Kadlec K, Gutiérrez M, et al. Nucleotide sequence and transfer properties of two novel types of *Actinobacillus pleuropneumoniae* plasmids carrying the tetracycline resistance gene tet(H)[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(4): 864-867.
- [10] Heery D M, Powell R, Gannon F, et al. Curing of a plasmid from *E. coli* using high-voltage electroporation[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(23): 10131.
- [11] Jahagirdar S, Patwardhan R, Dhakephakar P K. Curing plasmid-mediated vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* using herbal naphthoquinones[J]. J Hosp Infect, 2008, 70(3): 289-291.
- [12] Ni B, Du Z, Guo Z, et al. Curing of four different plasmids in *Yersinia pestis* using plasmid incompatibility[J]. Lett Appl Microbiol, 2008, 70(3): 289-291.
- [13] 杨瑶, 袁生, 戴亦军, 等. 烟碱羟基化菌株羧基毛单胞菌 JA1 抗性质粒的消除[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2007, 30(2): 77-80.
- [14] 李荃清, 周岐新, 凌保东. 耐药性质粒消除的研究概况与展望[J]. 川北医学院学报, 2003, 18(2): 168-171.
- [15] 项裕财. R 质粒的紫外消除试验改进和体会[J]. 皖南医学院学报, 2001, 20(2): 154.
- [16] 姜恺, 班睿, 赵学明. 细菌质粒的消除[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 99-103.
- [17] 刘渠, 白松涛, 叶梅君, 等. G⁺ 球菌及 G⁻ 杆菌质粒消除方法的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 1998, 8(5): 275-278.
- [18] 龙海英, 刘横川, 方梅. 质粒消除方法及质粒消除效果的评价研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(3): 413-415.
- [19] 黄必旺, 黄志鹏, 关雄. 电穿孔法用于大肠杆菌和苏云金杆菌的转化及质粒消除[J]. 福建农业大学学报, 1999, 28(1): 43-46.
- [20] 陈乃用. 电穿孔法在细菌质粒转化中的应用[J]. 微生物学通报, 1991, 18(2): 97-103.
- [21] Yang Y, Yuan S, Chen T, et al. Cloning, heterologous expression and functional characterization of the nicotinate dehydrogenase gene from *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Biodegradation, 2009, 20: 541-549.

- [22] 萨姆布鲁克 J拉 W. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [23] McKay G A, Woods D E, MacDonald K L, et al. Role of phosphoglucomutase of *Stenotrophomonas maltophilia* in lipopolysaccharide biosynthesis, virulence, and antibiotic resistance[J]. Infect Immun, 2003, 71(6): 3 068-3 075.
- [24] Avison M B, Higgins C S, von Hehlreich C J, et al. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 beta-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(2): 413-419.
- [25] Furushita M, Okamoto A, Maeda T, et al. Isolation of multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) from a marine fish farm[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(9): 5 598-5 600.
- [26] Zhang L, Li X Z, Poole K. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(12): 3 497-3 503.
- [27] Gould V C, Avison M B. SmeDEF-mediated antimicrobial drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates having defined phylogenetic relationships[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(6): 1 070-1 076.
- [28] Chang L L, Chen H F, Chang C Y, et al. Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 53(3): 518-521.
- [29] Hansen L H, Johannesen E, Bumolle M, et al. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(9): 3 332-3 337.
- [30] 孙二琳. 嗜麦芽寡养单胞菌耐药机制的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(7): 445-448.
- [31] Vatteroni L, Pias A, Sini S, et al. Analysis of electroporation-induced genetic damages in V79/A P4 Chinese hamster cells[J]. Mutat Res, 1993, 291(3): 163-169.
- [32] Higgins D R, Strathern J N. Electroporation-stimulated recombination in yeast[J]. Yeast, 1991, 7(8): 823-831.

[责任编辑: 孙德泉]