

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.32.009

脱氧核糖核酸酶抑制肺炎链球菌青霉素耐药基因转移的研究

徐 核¹, 谭艾娟², 吕世明³

(贵州大学:1. 药学院微生物与生化药学系;2. 生命科学学院;3 动物科学学院, 贵阳 550025)

[摘要] **目的** 探讨脱氧核糖核酸酶(DNase)抑制肺炎链球菌(SP)青霉素耐药基因转移的作用。**方法** 提取青霉素耐药 SP(PRSP)的 DNA,并进行相关试验鉴定;用 PRSP 的 DNA 转化 SP 标准菌株,转化后进行 Optochin 和苯唑西林药敏试验;用 DNase 抑制 PRSP 的 DNA 转化 SP 标准菌株,抑制转化后进行 Optochin 和苯唑西林药敏试验。**结果** 提取 DNA 阶段,Optochin 试验均显示阳性,苯唑西林药敏试验均显示青霉素不敏感,相关 DNA 检测均阳性;转化实验后,实验组和对照组的 Optochin 试验均显示阳性,实验组和对照组的苯唑西林药敏纸片抑菌环直径分别为(23.3±2.2)mm 和(33.5±3.0)mm,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$);抑制转化实验后,实验组和对照组的 Optochin 试验均显示阳性,实验组和对照组的苯唑西林药敏纸片抑菌环直径分别为(29.6±4.7)mm 和(17.6±9.4)mm,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** DNase 具有抑制 SP 青霉素耐药基因转移的作用。

[关键词] 肺炎链球菌;青霉素耐药基因;基因转移;脱氧核糖核酸酶
[中图分类号] R378.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)32-4119-04

Study on the DNase-mediated inhibition of penicillin resistance gene transfer among streptococcus pneumonia

XU He¹, TAN Aijuan², LV Shiming³

(1. Department of Microbiology and Biochemistry, College of Pharmacy;2. College of Life Science;3. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

[Abstract] **Objective** To explore the inhibition effect of Deoxyribonuclease (DNase) on penicillin resistance gene transfer among streptococcus pneumonia (SP). **Methods** The DNA of penicillin resistant SP (PRSP) was extracted and the related test of identification was conducted;SP standard strain was transformed by the DNA of PRSP. After the test of transformation,Optochin and Oxacillin susceptibility tests were conducted;the transfection was inhibited by DNase,Optochin and Oxacillin susceptibility tests were conducted after inhibition. **Results** In the DNA extraction stage,Optochin test was positive. Oxacillin susceptibility test showed that penicillin was not sensitive and the relevant DNA tests were positive. After transformation,Optochin test of the experimental group and the control group showed positive,the diameters of the bacteriostatic ring of Oxacillin-sensitive paper were (23.3±2.2) mm and (33.5±3.0) mm,respectively,the difference was statistically significant ($P<0.01$). After inhibition,Optochin test of the two groups were positive,the diameters of the bacteriostatic ring of the Oxacillin-sensitive paper in the experimental group and the control group were (29.6±4.7) mm and (17.6±9.4) mm,respectively,the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** DNase has the effect of inhibiting the gene transfer of penicillin resistance in SP.

[Key words] streptococcus pneumonia; penicillin resistance gene; gene transfer; deoxyribonucleases

细菌耐药已经成为严重的公共卫生危机,可能使人类重新面临感染性疾病的威胁。“遏制细菌耐药”已经成为医学界亟待解决的重大课题^[1]。细菌产生耐药性的机制有很多,其中,耐药基因通过转化、接合和转导在不同细菌间形成水平转移最为重要^[2]。因此,如果能抑制细菌的转化、转导和接合,即能抑制细菌耐药基因的转移,就可能抑制耐药菌或多重耐药菌的形成,为解决目前面临的严峻细菌耐药问题寻找到一种新的有效途径和方法^[3]。为此本研究旨在以肺炎链球菌(streptococcus pneumonia,SP)标准菌株作为受体菌,以青霉素耐药 SP(penicillin resistant SP, PRSP)的 DNA 作为外源性 DNA,以脱氧核糖核酸酶

(deoxyribonucleases, DNase)作为抑制剂^[4],通过转化和抑制转化实验,探讨 DNase 在 SP 转化过程中抑制 SP 青霉素耐药基因转移的作用,以便为探究 DNase 抑制 PRSP 和其他相关耐药菌的形成提供前期研究,为开发阻断耐药基因水平传播的新型药物提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)菌株来源:BNCC338425 SP 标准菌株购于北纳创联生物技术有限公司。临床分离的 PRSP 最低抑菌浓度[(MIC)≥2 μg/mL],由重庆医科大学北碚附属医院惠赠。(2)主要仪器与试剂:微量移液器购自上海求精生化试剂仪器有限公司。超

作者简介:徐核(1991—),硕士研究生,主要从事微生物与生化药学研究。

净工作台购自苏州安泰空气净化有限公司。SZ-9Z 自动三重纯水蒸馏器购自上海亚荣生化仪器厂。LDZX-30FBS 立式高压灭菌锅购自上海申安医疗器械厂。SH2-82A 恒温振荡器(摇床)购自常州澳华仪器有限公司。高速台式离心机(TGL-161)购自上海安亭科学仪器厂。电热恒温水槽(DK-8D)购自上海一恒科技有限公司。NanoPhotometer 超微量核酸测定仪购自德国的 Implen 公司。电热恒温箱购自上海贺德实验设备有限公司。FA2004 电子天平购自上海精科天平厂。脑心浸液肉汤(BHI 培养基)购自贵州鼎国生物技术有限公司。哥伦比亚血琼脂培养基购自重庆庞通医疗器械有限公司。苯唑西林药敏纸片购自贵阳宏硕生物科技有限公司。Optochin 药敏纸片购自上海金穗生物科技有限公司。DNase I 购自北纳创联生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 提取 PRSP 的 DNA 并进行相关鉴定 用微量移液器将 PRSP 保种液 200 μL 分别加入含 1 mL BHI 培养基的离心管中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床内振荡培养 13 h(大约为 SP 生长曲线平台期的后期),然后将每管少量的细菌培养液在校正为 0.5 麦氏比浊度后涂于血平板上并在其内贴上 Optochin 和苯唑西林药敏纸片进行 SP 的培养、生化鉴定和青霉素药敏试验,同时将每管内的细菌培养液用煮沸法提取 DNA 以致每管获得大约 70 μL 的 DNA 提取液,并检测 DNA 溶液的浓度和纯度。将 DNA 提取液储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内以备用于转化实验和 DNase 抑制实验。

1.2.2 用外源性 PRSP 的 DNA 转化 SP 标准菌株并进行相关鉴定 将消毒处理后的 SP 标准菌株的冻干管移入超净工作台内,将 0.3 mL 无菌水注入冻干管中并吹打以便使冻干菌粉充分溶解成菌悬液,将菌悬液接种至血平板上,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 及 5% CO_2 的电热恒温箱内培养。待血平板上的菌悬液培养 36 h 并生长出典型成熟的 SP 菌落后,依次挑取 SP 标准菌株的单菌落分别放入含 1 mL BHI 培养基的 20 个离心管中,然后将这些离心管随机分成 10 个实验组和 10 个对照组并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床内振荡培养。当细菌进入感受态时才能易于捕获外源性 DNA 继而发生转化,而 SP 的感受态出现在对数生长期的后期,依据 SP 生长曲线在振荡培养 6 h 后才开始进入对数生长期后期,待振荡培养 6 h 适时地向实验组的每个离心管内加入浓度为 $(87.3 \pm 47.3) \mu\text{g}/\mu\text{L}$ PRSP 的 DNA 提取液 140 μL ,同时向对照组的每个离心管内加入浓度为 0.9% 的盐水 140 μL ^[5]。当细菌群体的生长繁殖处于对数期和稳定期交汇点时,液体培养基内的被转化和未被转化的活细菌数已达到顶峰并且细菌转化窗口已经关闭(SP 感受态持续约 40 min)^[5],依据 SP 生长曲线这个交汇点大约为 9 h,当振荡培养 9 h 实验组和对照组同时结束培养^[6]。然后取实验组和对照组的每管少量细菌培养液在校正为 0.5 麦氏比浊度后涂于血

平板上并在其内贴上 Optochin 和苯唑西林药敏纸片进行 SP 的培养、生化鉴定和青霉素药敏试验。

1.2.3 DNase 抑制 PRSP 的 DNA 转化 SP 标准菌株并进行相关鉴定 SP 标准菌株的冻干菌粉复活培养与以上相关操作相同,实验组和对照组的培养容器、培养基、培养的最初菌落数、培养的随机分组及其他培养条件亦与以上相关内容相同。当实验组和对照组在摇床内培养 6 h 时,向实验组的每个培养管中加入 PRSP 的 DNA 溶液 140 μL 和浓度为 18.75 U/ μL 的 DNase 溶液 100 μL (溶剂为生理盐水),以及分别向对照组的每个培养管中加入 PRSP 的 DNA 溶液 140 μL 。当振荡培养 9 h 时实验组和对照组结束培养。然后取实验组和对照组的每管少量细菌培养液在校正为 0.5 麦氏比浊度后涂于血平板上并在其内贴上 Optochin 和苯唑西林药敏纸片进行 SP 的培养、生化鉴定和青霉素药敏试验。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个独立样本比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 提取 PRSP 的 DNA 及相关鉴定结果 在 PRSP 保种液活化培养后,各培养管细菌的 Optochin 试验均显示阳性,即 Optochin 纸片的抑菌环直径均大于 14 mm;苯唑西林药敏试验显示各培养管细菌对青霉素不敏感,即苯唑西林药敏纸片的抑菌环直径均小于或等于 19 mm;从各培养管的细菌悬液中均提取到 DNA,即每管 DNA 提取液的体积约 70 μL 并且浓度为 $(87.3 \pm 47.3) \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.2 PRSP 的 DNA 转化 SP 标准菌株及相关鉴定结果 在转化实验后,实验组和对照组细菌的 Optochin 纸片抑菌环直径均大于 14 mm,Optochin 试验均显示阳性;在实验组的苯唑西林药敏试验中在每个抑菌圈外均有一个明显的由低到高直至正常菌落密度的铜钱状的抑菌环带,而在对照组的苯唑西林药敏试验中在每个抑菌圈外无此特征性的抑菌环带;实验组苯唑西林药敏纸片的抑菌环直径为 $(23.3 \pm 2.2) \text{mm}$,对照组苯唑西林药敏纸片的抑菌环直径为 $(33.5 \pm 3.0) \text{mm}$,两组比较差异有统计学意义($t = -8.74, P < 0.01$)。原始结果见图 1。

2.3 DNase 抑制 PRSP 的 DNA 转化 SP 标准菌株及相关鉴定结果 在抑制转化实验后,实验组和对照组细菌的 Optochin 纸片抑菌环直径均大于 14 mm,Optochin 试验均显示阳性;在对照组的苯唑西林药敏试验中在每个抑菌圈外均有一个明显的由低到高直至正常菌落密度的铜钱状的抑菌环带,而在实验组的苯唑西林药敏试验中抑菌圈外的抑菌环带与对照组相比减弱;实验组、对照组苯唑西林药敏纸片的抑菌环直径分别为 (29.6 ± 4.7) 、 $(17.6 \pm 9.4) \text{mm}$,两组比较差异有统计学意义($t = 3.60, P < 0.05$)。原始结果见图 2。

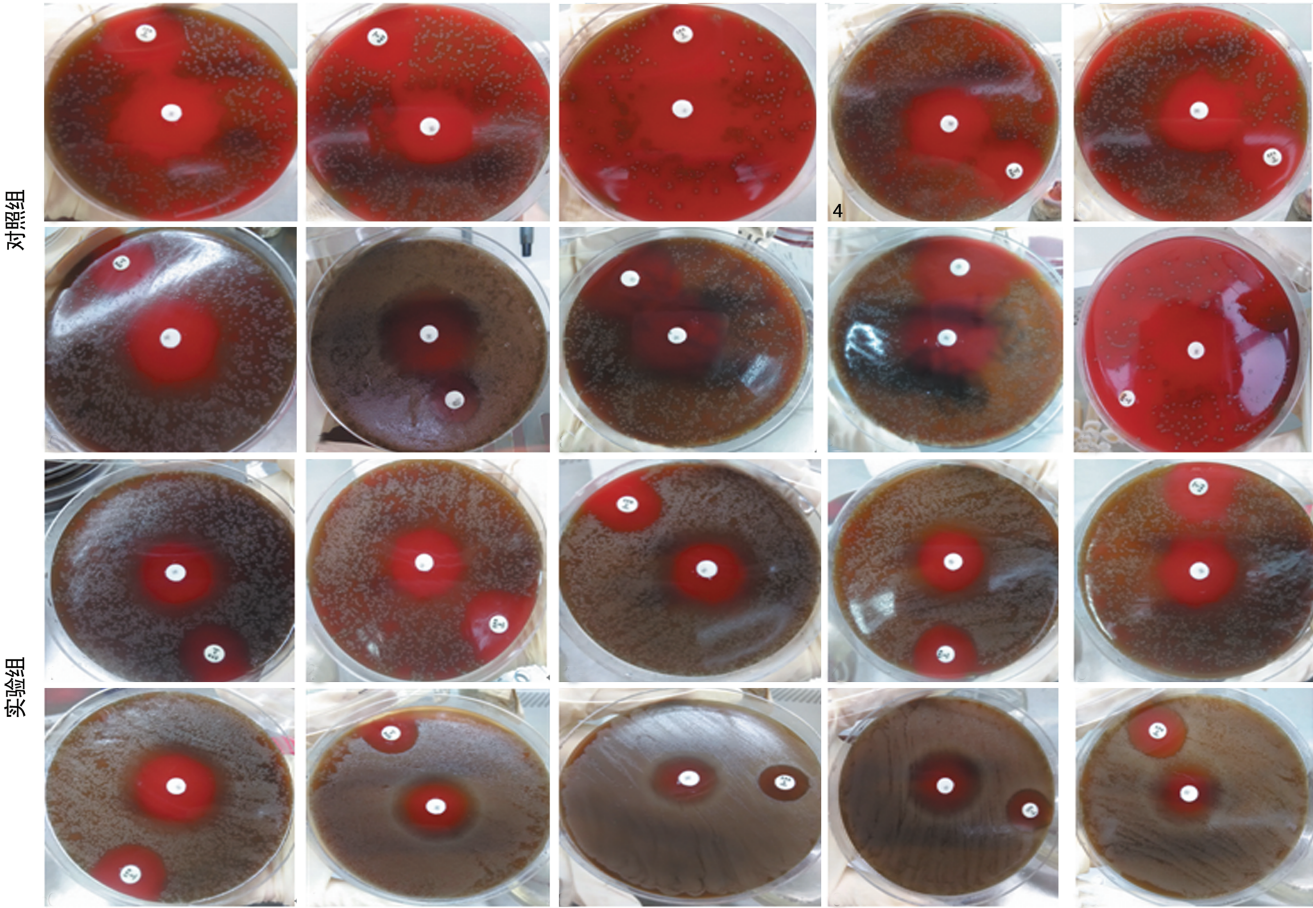


图 1 转化实验后对照组和实验组的 Optochin 试验和青霉素药敏试验图片

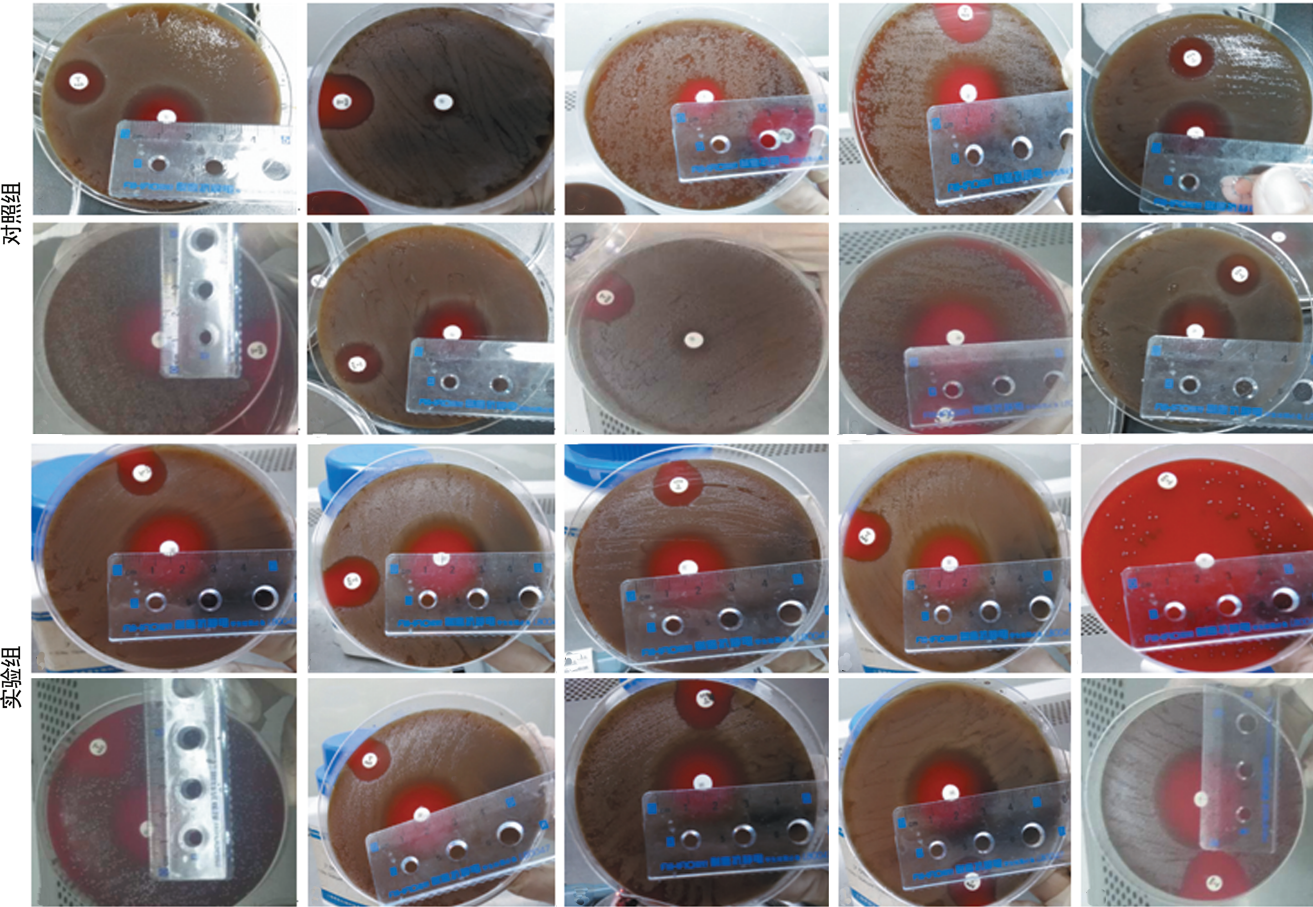


图 2 抑制转化实验后对照组和实验组的 Optochin 试验和青霉素药敏试验图片

3 讨 论

由于广谱抗菌药的滥用及细菌间耐药基因的转移,细菌对常用抗菌药物耐药的发展已成为人类健康事业面临的严重问题之一^[7]。因此,合理应用抗菌药物是其主要应对措施,而开发的新型抗菌药物不能随时满足临床耐药菌感染治疗的需求^[1],阻断细菌间耐药基因转移的技术和药物也很匮乏,以致使细菌耐药危机日趋严峻^[8]。鉴于细菌间耐药基因的水平传播是当今细菌产生耐药性的重要原因,探寻切断细菌间耐药基因水平传播的新技术和新药物将是破解细菌耐药危机的重要途径之一。为此,本研究以 SP 标准菌株作为受体菌,以 PRSP 的 DNA 作为外源性 DNA,以 DNase 作为抑制剂,通过转化和抑制转化实验,探讨 DNase 在 SP 转化过程中抑制 SP 青霉素耐药基因转移的作用,为开发阻断耐药基因水平传播的新型药物提供新思路。

本研究在提取 DNA 实验阶段,获取了含 SP 青霉素耐药基因的外源性 DNA 提取液。在对 PRSP 菌株($MIC \geq 2 \mu g/mL$)培养后,培养后的细菌 Optochin 试验显示阳性和青霉素药敏试验显示不敏感,说明 PRSP 菌株在培养过程中未被杂菌污染,培养后的细菌仍然是 PRSP。用煮沸法从培养后的细菌悬液提取 DNA 后, DNA 提取液的检测结果显示从各培养管的细菌悬液中均提取到 DNA,表明每管均提取了 PRSP 的 DNA。而据文献报道,SP 临床菌株对 β -内酰胺类抗生素耐药性与 pbp2b、pbp2x 和 pbp1a 基因突变密切相关^[9],其中 pbp2x 基因突变可介导 pbp2b、pbp1a 等其他 pbps 基因突变, pbp2b 基因突变导致低水平青霉素耐药, pbp2b 和 pbp1a 基因突变导致高水平青霉素耐药^[10]。结合以上研究,表明本研究从 PRSP 中提取的 DNA 应该含有 pbp2b、pbp2x 和 pbp1a 突变基因,符合本研究转化需要的含 SP 青霉素耐药基因的外源性 DNA。

本研究在转化实验阶段,用含 SP 青霉素耐药基因的外源性 DNA 提取液,使 SP 标准菌株转化为青霉素低敏感的菌株。依据转化实验后的 Optochin 试验阳性结果,可判断在转化实验过程中实验组和对照组的 SP 均未受到杂菌污染;基于转化实验后的苯唑西林药敏试验结果:实验组抑菌环直径小于对照组($P < 0.01$),可判断实验组的细菌获得了青霉素低敏感性状;根据对照组的对等、同步和专设的作用^[11-12],判定实验组细菌获得的青霉素低敏感性状不是由非处理因素引起,而是由含 SP 青霉素耐药基因的外源性 DNA 引起^[5];根据文献^[12]报道可知,实验组细菌获得的青霉素低敏感性状是 SP 标准菌株摄入了 SP 青霉素耐药基因并成功地重组和表达的结果。实验组的特征性抑菌环带也间接地支持上述分子机制,因为只有不同的 SP 标准菌在转化实验过程中摄入不同种类的青霉素耐药基因并成功地重组和表达,使

SP 标准菌株转化为多种青霉素低敏感菌株,才能在抑菌圈外出现铜钱状的抑菌环带。

本研究在抑制转化实验阶段,用 DNase 抑制了 SP 标准菌株转化为青霉素低敏感菌株,显示 DNase 具有抑制 SP 青霉素耐药基因转移的作用。基于抑制转化实验后的 Optochin 试验阳性结果,可推断在抑制转化实验过程中实验组和对照组的 SP 均未受到杂菌污染。依据抑制转化实验后的苯唑西林药敏试验结果:实验组抑菌环直径大于对照组($P < 0.05$),可推断 DNase 抑制了 SP 标准菌株转化为青霉素低敏感菌株。根据实验组的抑菌环带与对照组相比减弱,也可支持 DNase 抑制了 SP 标准菌转化为青霉素低敏感菌株。由于生物大分子 DNase 不易进入细菌内,不可能作用于外源性基因的重组和表达,很可能作用于外源性基因的转移环节,因而 DNase 的分子抑制机制既有 DNase 随机剪切外源性 SP 青霉素耐药基因以显示抑制 SP 青霉素耐药基因转移的效应,又有 DNase 特异切割 SP 青霉素耐药基因调控序列以显现抑制 SP 青霉素耐药基因转移的功能^[13-15]。

总之, DNase 具有抑制 SP 青霉素耐药基因转移的作用,是依次通过外源性 DNA 提取实验、SP 的转化实验和 SP 的抑制转化实验而揭示。本研究结果表明, DNase 具有阻抑 PRSP 形成的潜在功能;同时,还表明 DNase 具有阻抑一些其他耐药菌形成的潜在作用。本研究结果将为深入研究 DNase 阻抑耐药细菌形成和开发阻断耐药基因水平传播的药物提供前期研究及思路。

参考文献

- [1] 肖永红. 细菌耐药:挑战与对策[J]. 中国执业药师·抗菌药物合理应用专刊, 2011, 8(6): 3-8.
- [2] 董杰. 细菌获得性抗生素耐药基因研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2015, 16(1): 71-74.
- [3] 侯芳, 吕媛. 不容忽视的细菌耐药[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(3): 203-206.
- [4] 倪玉华, 张建军, 孙宝贵. DNA 酶 I 的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(6): 531-535.
- [5] 贾文祥, 陈锦英, 江丽芳, 等. 医学微生物学[M]. 成都: 四川大学出版社, 2005: 38.
- [6] 赵清, 李楠, 张雪梅, 等. 肺炎链球菌转化模型的建立[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(9): 804-806.
- [7] 王蓉, 柴栋. 细菌耐药机制与临床治疗对策[J]. 国外医药抗生素分册, 2003, 24(3): 97-102.
- [8] 夏照帆, 吕开阳, 汤陈琪, 等. 我国细菌耐药问题的现状和防控策略[J]. 中国工程科学, 2017, 19(2): 106-111.
- [9] 俞春松, 吴学虹, 黄琴美, 等. 肺炎链球菌 pbp2B、pbp2X 和 pbp1A 基因突变与 β -内酰胺类耐药相关性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(12): 3249-3252.
- [10] 周侠, 杨致邦, 栗俊杰, 等. 肺炎链球菌 pbp2b 和 pbp1a 基因突变与青霉素耐药的相关性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(8): 726-729.

及其作用机制,希望能够为临床 PD 的治疗提供数据参考。本研究结果显示治疗组和模型组大鼠的旋转圈数明显多于对照组($P<0.05$),而治疗组的旋转圈数明显低于模型组($P<0.05$)。该结果从行为学角度研究认为辛伐他汀能明显改善 PD 大鼠的临床表征。

有基础实验发现,黑质多巴胺神经元的退行性病变与 TNF- α 和炎症因子具有密切联系,并认为 TNF- α 与 IL-6 的表达可损伤 DA 神经^[12]。CRP 是机体非特异性免疫机制的一部分,可激活补体的经典途径,增强白细胞的吞噬作用,调节淋巴细胞或单核/巨噬系统功能,促进巨噬细胞组织因子的生成^[13]。本研究发现治疗组和模型组大鼠的血清 CRP、TNF- α 、IL-6 明显高于对照组($P<0.05$),治疗组的血清 CRP、TNF- α 、IL-6 水平明显低于模型组($P<0.05$)。该结果提示辛伐他汀可通过炎性反应水平改善 PD 大鼠的临床症状。

SHALBAY 等^[14]研究发现,AD、PD 等多种疾病和神经系统功能损伤均存在 iNOS 的表达。本研究发现治疗组和模型组大鼠的黑质区 iNOS 表达强度明显高于对照组($P<0.05$),治疗组的黑质区 iNOS 表达强度水平明显低于模型组($P<0.05$)。上述结果提示辛伐他汀可通过对激活的神经胶质细胞介导的氧化应激反应产生抑制作用。治疗组和模型组大鼠的黑质区 BDNF、TrkB、NPY 表达强度明显低于对照组($P<0.05$),但治疗组的黑质区 BDNF、TrkB、NPY 水平明显高于模型组($P<0.05$)。该结果说明辛伐他汀可通过改善 BDNF、TrkB、NPY 的活性达到治疗 PD 大鼠的效果。相关研究发现,TrkB 受体可通过自动磷酸化与配体 BDNF 共价结合激活细胞内信号转导途径;轴突切断后,脊髓内运动神经元可出现 TrK-BmRNA 表达增加^[15],提示 BDNF 有可能通过其受体 TrkB 受体发挥再生与存活效应。

综上所述,辛伐他汀能明显降低 PD 大鼠的炎性反应水平、改善 BDNF、TrkB、NPY 的活性及降低 iNOS 表达,从而达到治疗 PD 大鼠的效果。

参考文献

[1] 王焱,唐北沙,曹学兵,等.辛伐他汀对脂多糖诱导帕金森病大鼠多巴胺神经元损伤的保护作用[J].中华行为医学与脑科学杂志,2015,24(3):193-197.

[2] 刘俊华,王勇,王颜颜,等.深部脑磁刺激对帕金森病模型大鼠运动症状治疗的安全性评价[J].首都医科大学学

报,2017,38(2):260-267.

[3] 何国荣,穆鑫,李晓秀,等.百可利对 6-羟多巴胺不同注射位点帕金森病模型大鼠的治疗作用[J].中国药理学通报,2015,18(5):623-629,630.

[4] 张海龙,李智高,李玉,等.胚胎中脑神经干细胞移植治疗大鼠帕金森病模型[J].广东医学,2016,37(1):49-51.

[5] 王晓晓,付文玉,庄文欣,等.慢病毒介导核受体相关因子 1 基因修饰骨髓间充质干细胞移植治疗帕金森病模型大鼠[J].解剖学报,2015,46(6):742-749.

[6] BRAKEDAL B, HAUGARVOLL K, TZOULIS C. Simvastatin is associated with decreased risk of Parkinson disease[J]. Ann Neurol, 2017, 81(2):329-330.

[7] 潘士锋,臧娇,薛莹,等.骨髓间充质干细胞移植对帕金森病模型大鼠纹状体多巴胺水平的影响[J].畜牧与兽医,2016,48(11):1-4.

[8] AHMED L A, DARWISH H A, ABDELSALAM R M, et al. Role of Rho kinase inhibition in the protective effect of fasudil and simvastatin against 3-Nitropropionic Acid-Induced striatal neurodegeneration and mitochondrial dysfunction in rats[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(6):3927-3938.

[9] 梁建庆,何建成,王政.三七总皂苷治疗帕金森病大鼠的作用靶标研究[J].中华中医药杂志,2015,18(5):1575-1579.

[10] ZHANG C, WU J M, LIAO M, et al. The ROCK/GG-Tase pathway are essential to the proliferation and differentiation of neural stem cells mediated by simvastatin[J]. J Mol Neurosci, 2016, 60(4):474-485.

[11] 张阳,张志坚,俞晓岚,等.慢病毒介导新型 Tet-On 系统调控大鼠 GDNF 和 TH 双基因表达对帕金森病大鼠的实验研究[J].中国药理学通报,2015,31(2):251-256.

[12] LIN K D, YANG C Y, LEE M Y, et al. Statin therapy prevents the onset of Parkinson disease in patients with diabetes[J]. Ann Neurol, 2016, 80(4):532-540.

[13] 王述菊,马彪,马骏,等.电针对帕金森病模型大鼠纹状体相关蛋白 mRNA 表达的影响[J].中国针灸,2015,35(7):697-701.

[14] SHALABY S Y, LOUIS E D. Statin use and its association with essential tremor and parkinson's disease[J]. Neuroepidemiology, 2016, 47(1):11-17.

[15] 王述菊,余沛豪,马骏,等.电针对鱼藤酮诱导的帕金森病模型大鼠黑质内自噬相关蛋白表达的影响[J].辽宁中医杂志,2017,38(9):1812-1815.

(收稿日期:2018-03-18 修回日期:2018-06-14)

(上接第 4122 页)

[11] 颜虹,徐勇勇,赵耐清.医学统计学[M].北京:人民卫生出版社,2005:11-12.

[12] 孙东昌,张衍梅,施跃峰.细菌自然转化的分子机制研究进展[J].微生物学报,2012,52(1):6-11.

[13] SABO P J, KUEHN M S, THURMAN R, et al. Genome-scale mapping of DNase I sensitivity in vivo using tiling DNA microarrays[J]. Nature Methods, 2006, 3(7):511-

518.

[14] 周会霞,杨广龙,李云华,等.链球菌分子分型及传播机制的研究[J].现代医学,2017,45(2):215-220.

[15] 翁幸璧,糜祖煌.可移动遗传原件:耐药基因的载体[J].中国人兽共患病学报,2013,29(4):389-397.

(收稿日期:2018-03-11 修回日期:2018-06-12)