

细菌内源质粒消除研究进展

冯俊, 张伟, 宋存江*

南开大学, 分子微生物与技术教育部重点实验室, 天津 300071

摘要:为了探究细菌内源质粒的功能, 包括细菌耐药性、细菌共生、细菌荚膜形成、细菌的重金属抗性等方面, 需要对细菌的内源质粒进行消除。本文综述了基于物理学、化学及分子生物学的细菌内源质粒消除方法, 阐明了质粒消除的原理。结合笔者自身的研究对质粒消除技术进行了展望。

关键词:质粒消除, 消除方法, 消除原理

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 11-1142-07

质粒是能够在染色体外自主复制的遗传因子。质粒上携带有多种基因使得细菌具有某些特殊表型。如: 抗生素抗性、致病性、代谢能力、共生能力和接合转移等^[1]。

内源质粒可以自发地从细菌中丢失, 但其丢失效率很低, 仅为 $10^{-2} - 10^{-8}$ ^[2]。为了提高内源质粒的丢失效率, 可采用包括物理学、化学、分子生物学手段来人为干预。本文将质粒的消除方法进行了分类归纳, 并对消除机制进行了探讨。

1 物理学消除方法

通过物理手段消除质粒是最简单的质粒消除方法。其优点是消除实验简单, 操作容易且不会对细菌自身的基因组造成影响, 不存在突变风险。常用以下几种方法:

1.1 高温

高温是最常用的物理消除方法。Leavitt 等^[3]为

了研究肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 内源质粒与细菌耐药性关系, 将菌株于 42℃ 高温培养 (最适温度 37℃), 每 2 天传代 1 次, 培养 2 周以后检测, 成功消除了 *K. pneumoniae* 557 菌株的内源质粒。高温消除质粒的机理在于: 改变质粒结构, 引起消除。Ghosh 等^[4]以 42℃ 高温对酸胞菌属 (*Acidocella* sp.) GS19h 的内源质粒进行消除时发现传代 4 次后, 细菌内含有大小为 26.7、36 和 77 kb 的 3 个内源质粒均已消失。但出现了 3 个新的大小分别为 72、75 和 86.3 kb 的质粒。将该菌株在最适温度 30℃ 进行培养, 细菌内仍未发现原始质粒, 而新形成的质粒依旧存在。可见细菌质粒结构发生了永久性改变。将该菌株于 42℃ 传代 10 代以后, 细菌内没有质粒存在, 原始质粒和新形成质粒均丢失。由此推测高温使得细菌质粒不稳定, 质粒结构发生变化, 传代多次以后就会出现质粒消除现象。另外, 还有一些质粒本身属于温度敏感型质粒如 pKSV7, 提高温度质粒复制受阻, 从而造成质粒的丢失^[5]。

基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究计划 (2012CB725204); 国家“863 计划” (2012AA021505); 国家自然科学基金项目 (31070039, 31170030, 51073081)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-22-23503866; E-mail: songcj@nankai.edu.cn

作者简介: 冯俊 (1987-) 男, 陕西宝鸡人, 硕士研究生, 研究方向为生物大分子的催化与合成。E-mail: fengjun909@126.com

收稿日期: 2013-03-23; **修回日期:** 2013-06-04

1.2 高压电穿孔

Dower 等^[6]发现电穿孔不但可以用于细菌转化还可用于制备质粒。Heery 等^[7]第一次报道了用高压电穿孔方法成功消除大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH1 的内源质粒 pUG2。其先用过夜的 *E. coli* 菌液制备电穿孔细胞,然后将细胞在 2.5 kV, 25 μ F 条件下电击,实验发现 80% 的菌株消除了内源质粒。电穿孔方法消除质粒是因为细菌的细胞膜和细胞壁在高电压下被击穿,表面形成很多孔洞,内源质粒从孔洞流出细胞,造成细菌质粒消除。

1.3 原生质体形成与再生

Novick 等^[8]在金黄色酿脓葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 中利用原生质体形成与再生的方法消除了内源质粒,且消除效率达 80%。原生质体形成与再生法消除原理为:在原生质体制备的过程中细菌的细胞壁被去除,造成了质粒复制过程中分配机制的破坏,从而导致质粒消除。

其他物理消除方法还有微波处理, Berzin 等^[9]第一次利用 2.5 GHz 微波处理细菌,成功消除了梭菌属 (*Clostridium* sp.) MT962 内源质粒 pMT351,质粒消除效率达到 42% - 47%。对于拷贝数较低或者化学试剂较难进入细胞的细菌质粒消除可选择用物理消除方法。

2 化学消除方法

利用化学试剂消除质粒的方法使用最为广泛。该方法消除质粒的作用靶位点主要有两个:一个与细菌的细胞膜相关。质粒和染色体复制都需要结合在细胞膜上,细胞膜上质粒结合位点的破坏会导致质粒复制受阻,造成内源质粒丢失。另一个与质粒的复制相关,涉及质粒的复制、分配和分离。在复制过程中任何一个环节质粒或者质粒复制所需的酶被抑制,都将导致质粒复制异常,进而造成质粒丢失。

2.1 吩噻嗪类

Spengler 等^[10]研究了一系列吩噻嗪及其衍生物对 *E. coli* K12LE140 的质粒消除作用,此类试剂的质粒消除效率从 0.01% 到 90% 不等。吩噻嗪类化合物可以与细菌的 DNA 结合。在细胞中与细菌 DNA 的结合效率依次为质粒 DNA、线性或者开环质粒、最后为染色体 DNA。将质粒 DNA 和吩噻嗪类化合物混合进行电泳分析,发现超螺旋的质粒消失,

而开环或者线性质粒的比率增加。推测此类化合物结合质粒以后,会在质粒上形成切口,造成质粒解螺旋,从而导致质粒不能复制^[11-13]。吩噻嗪类化合物还可以通过抑制 DNA 促旋酶的活性来抑制质粒复制。Molnár 等^[14]发现向藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 中提取出来的 DNA 促旋酶中加入吩噻嗪后, DNA 促旋酶活性受到抑制。氯丙嗪可以通过其阳离子胺基团与细胞膜上的磷脂结合,疏水基团与细胞膜上的脂肪酸链结合,推测此化合物的消除作用还与细胞膜的脂水分配系数有关。还有报道称一些化合物的消除机制与其抑制细胞膜上的质子泵有关^[10]。吩噻嗪类化合物由于作用靶点多,属于非诱变杂环化合物因而具有优越性,可被广泛用于质粒消除。

2.2 嵌合染料

嵌合染料主要有吡啶橙、吡啶黄、溴化乙锭 (EB) 等。Mathema 等^[15]利用 EB 成功消除了肠杆菌 (*Enterobacter*) 的内源质粒,并证明此质粒与 HgCl₂ 的耐受有关。此方法还成功用于其它细菌的质粒消除如 *E. coli*^[16]、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)^[17] 等。EB 最大的缺点在于它本身是一种诱变剂,在消除质粒的同时,易造成细菌染色体突变。EB 诱导突变主要表现为 DNA 片段的缺失^[18]。Hraota 等^[19]于 1960 年报道用吡啶染料消除了 *E. coli* 质粒。Akinjogunla 等^[20]利用吡啶橙成功消除了 *S. aureus* 的多个内源质粒,消除效率为 50% - 87.5%。嵌合染料的作用机理与吩噻嗪类似,它们可以优先与细菌质粒结合,然后在质粒上形成切口,造成质粒复制受阻,从而消除质粒。Nakamura 等^[21]发现在加入吡啶染料的同时添加无机磷酸盐可以提高细菌对染料的敏感度,增加质粒消除效率。显微镜观察发现其细胞膜和细胞质结构发生了变化,而单独添加嵌合染料没有此变化。由于 EB 具有 DNA 诱变作用,因此嵌合染料主要选择安全,无突变作用的吡啶橙、吡啶黄等作为消除试剂。

2.3 抗生素类

因为大多数质粒消除试剂都具有抗菌性质,因此抗生素对质粒消除的作用亦被广泛研究。很多抗生素类药物都可用于质粒消除,如新生霉素、曲伐沙星、利福平、丝裂霉素 C 等。其中新生霉素的运用最为广泛。Karthikeyan 等^[22]以 SDS、EB、新生霉素、吡啶黄作为消除剂对嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus*

acidophilus) 内源质粒的消除进行了研究。结果发现在 *L. acidophilus* 中新生霉素的消除效果最明显, 消除效率为 4.6%。此类消除剂的消除机制复杂, 目前较清楚的是新生霉素和曲伐沙星。它们作为 DNA 促旋酶抑制剂, 能抑制促旋酶活性, 使得质粒复制中间体在细菌体内大量积累, 造成质粒复制异常从而导致质粒丢失^[23-24]。丝裂霉素 C 推测可能抑制 DNA 复制而造成质粒复制受阻, 质粒丢失^[23]。

2.4 表面活性剂

表面活性剂如脱氧胆酸、Tween 80、Triton X-100、SDS 等也被用于质粒消除。其中 SDS 是最常用的表面活性剂消除试剂。Lavanya 等^[25] 利用 SDS 结合高温 37°C (最适温度 30°C) 对 7 株乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 内源质粒进行消除实验, 并成功消除其中 5 株菌的内源质粒。其消除质粒的机制可能为: 表面活性剂可以溶解膜蛋白, 破坏细胞膜, 从而破坏细胞膜上质粒复制所必需的结合位点, 导致质粒不能正常复制, 造成分裂时质粒丢失。

2.5 其他化学试剂

还有一些植物提取物、中药等也发现有质粒消除作用。Beg 等^[26] 发现白花丹提取物具有较高的质粒消除效率, 其对细菌 R 质粒的消除效率可达到 14%。中药在质粒消除方面主要研究其对细菌 R 质粒的消除作用。金银花、黄芩、黄连、大黄、马齿苋、车前子、黄柏、鹅不食草等以及一些复方制剂三黄片、止痢灵、复方蒲公英等都有不同程度的质粒消除效果^[27]。由于中药的成分复杂, 其消除机理还不清楚。但可推断是中药成分中的某些物质可以作用于质粒消除的靶位点, 从而造成质粒消除。

影响质粒消除效果的因素除了试剂本身以外, 还有其他因素影响消除效果。首先是消除试剂的作用浓度。最小抑制浓度 (MIC) 是指在 18 h 内看不到细菌生长所需的最小的抑制剂浓度。大多数菌株在消除剂的最小抑制浓度作用下, 质粒消除效率最高。甚至有些菌株只在某些消除试剂最小抑制浓度作用下才会有质粒消除现象。其次在消除传代时细菌的初始细胞浓度对消除效率也影响巨大。Spengler 等^[10] 发现用浓度为 4.68×10^{-4} mol/L 丙咪嗪消除 *E. coli* K12F_{lac} 菌株内源质粒, 当初始细胞浓度为 2×10^3 /mL 时质粒消除效率最高达到 57%, 而其他浓度最高消除效率仅为 12%。细胞膜

的通透性也是一个重要因素, 有些试剂由于细胞膜屏障不能进入细胞而造成消除效率低或不能消除。

研究还发现化学试剂的质粒消除动力学曲线基本一致。如图 1, a 和 b 分别为质粒消除效率近指数增长的开始时间和结束时间。在 0-a h, 质粒消除现象几乎检测不到。a-b h, 质粒消除效率大幅增加。b h 以后质粒消除效率趋于稳定, 达到最大值。

利用化学方法进行消除实验, 首先要探索此化学试剂对目标菌株的最小抑制浓度。然后在添加最小抑制浓度试剂的条件下, 配合物理的高温处理, 多次传代以及较小的接种浓度可大大提高质粒消除效率。由于同一种消除试剂对不同菌株质粒消除效率差别很大, 因此选择不同类型的消除试剂同时进行消除实验可以提高质粒消除的成功率。

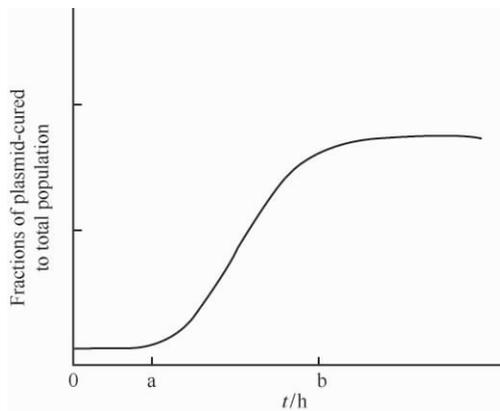


图 1. 细菌质粒消除动力学曲线^[28]

Figure 1. The kinetic curves of plasmid curing^[28].

3 分子生物学消除方法

分子生物学消除方法的优点是作用机理和作用靶点明确, 消除效率高。主要包括两类: 一类为借助转座子消除质粒; 另一类为利用质粒不相容性消除质粒。

3.1 借助转座子消除质粒

3.1.1 间接利用转座子消除质粒: 需要消除的内源质粒只有一部分具有明显特征, 可以通过简单的方法筛选出质粒消除突变株。如消除具有抗性的质粒, 突变菌株就表现为抗性敏感型, 可通过平板影印快速筛选出来。然而大多数质粒属于隐蔽质粒, 它们的特征未知, 缺乏适合的筛选标签使筛选非常

困难,因此考虑在其质粒上通过转座子导入抗性基因或者反向筛选标记,减少筛选困难,提高筛选效率。Barreto 等^[29]将 1 个含有 RP4 质粒 *oriT* 位点和 *nptI-sacB-sacR* 表达盒的 Tn5 转座子插入到热带根瘤菌 (*Rhizobium tropici*) CIAT 899 内源质粒上,使得质粒获得了对蔗糖敏感的反向筛选标记。通过高温处理一段时间后,在含有 20% 蔗糖的培养基上筛选获得消除内源质粒的突变菌株。

3.1.2 直接利用转座子消除质粒: Imre 等报道了基于转座子两步法消除肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) 2102 毒性质粒的方法^[30](见图 2)。首先构建了 1 个含有卡那抗性基因和 2 个连在一起的 IS30 末端的 Tn10 转座单元。此转座单元位于复制缺陷型质粒 pJKI336 上。然后将此自杀质粒转入至 *S. enteritidis* 中, Tn10 转座单元会随机插入到细菌染色体或质粒上去,通过筛选获得转座单元插入到质粒上的突变株。随后,在细菌中导入表达载体 pJKI132,此质粒含有可诱导的 IS30 转座酶基因。

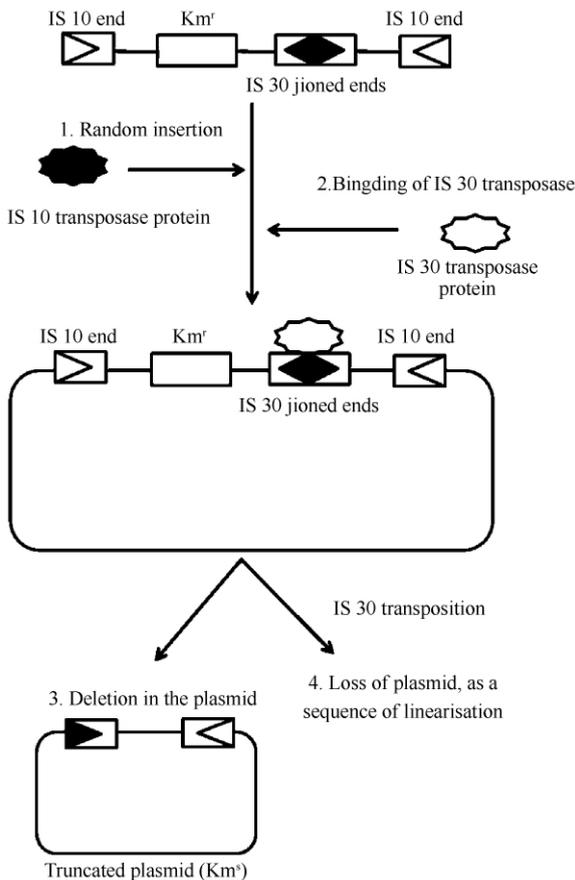


图 2. 转座子介导的质粒消除示意图^[30]

Figure 2. Transposon-based plasmid elimination^[30].

此酶可识别高活性的 IS30 位点,促使其分子内转座。诱导其表达可以导致质粒自身消除或者质粒线性化,从而造成质粒不稳定,进而导致质粒完全丢失。

其他利用转座子介导技术的消除方法还有 Tn5-*rpsL*^[31]和 Tn1-*amp*^[32],这些系统的基本原则是引入了一些具有明显特征的基因,易于消除突变株的筛选。此类方法由于是对目标质粒进行操作,因此主要用于一些单拷贝或者拷贝数低的质粒的消除。

3.2 质粒不相容性消除质粒

质粒不相容性是指同种或者亲缘关系较近两种质粒不能稳定存在于同一细胞中的现象。利用质粒不相容性消除质粒的技术,是通过引入第 2 个复制子,使得原始质粒遗传行为不稳定,该机理基于:①两个质粒分享一个或多个质粒复制或分配系统中的因子;②不相容质粒干扰内源质粒的拷贝数。导入外源质粒后,在外界选择压力存在下,导入质粒会在复制竞争过程中占优势,经过多次传代就会出现内源质粒消除现象。虽然此方法在质粒消除方面已经有了广泛的应用,但限制条件是消除之前必须清楚控制质粒复制或分配的区域。Wang 等^[33]将 pXO2 质粒的复制原点 and 复制蛋白基因插入到温度敏感型 pKSV7 载体中,成功构建不相容质粒 pKSV7-oriIV,在含有氯霉素的培养基中 30°C 传代多次,最终消除了炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*) A16 的 pXO2 质粒。Liu 等^[34]利用相同的方法消除了 *B. anthracis* A16 和 *B. anthracis* A16R 中的 pXO1 质粒。

分子方法消除质粒虽然操作较其他方法复杂,但是它的靶向性较强,不但可以用于增加筛选标记,提高筛选效率,还可针对细菌中某个特定质粒进行消除。

4 内源质粒消除实例

作者所在研究室分离得到 1 株谷氨酸非依赖型 γ -PGA 产生菌——解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) LL3^[35]。全基因组测序发现该菌株中含有 1 个 6758 bp 的内源质粒 (pMC1)^[36]。为了探明其功能,为随后的分子生物学研究奠定基础,需要对内源质粒进行消除。笔者采用 SDS 和吡啶

橙结合高温对细菌进行处理,传代多次以后没有检测到质粒消除的突变菌株。选择使用质粒不相容性消除方法,步骤与上述 Wang 等^[33]方法相同。分别将质粒的复制原点和复制蛋白基因连接到温敏型质粒 pKSV7 上,获得不相容质粒 pKSV7-rep-ori (如图 3)。利用不相容质粒成功消除了内源质粒 pMC1,消除效率高达 93%。

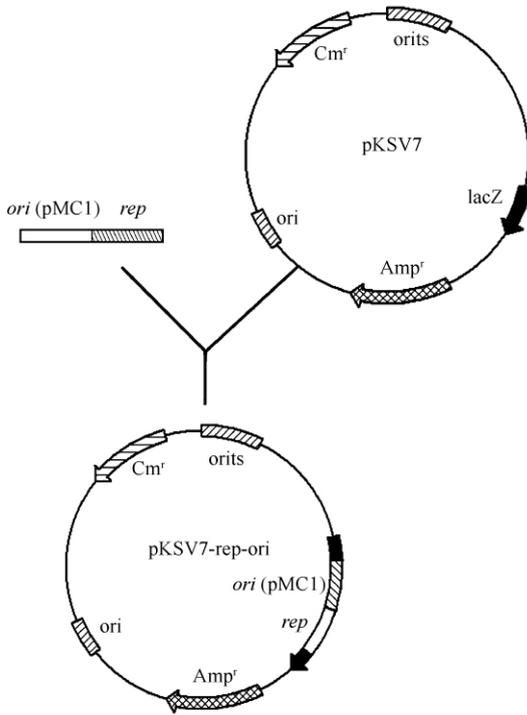


图 3. 不相容质粒构建示意图

Figure 3. Construction of the incompatible plasmid.

总之,当欲进行质粒消除时,一般先选择操作较为简单的化学和物理高温相结合的方法。为了提高实验成功率,可同时选择机制不同的化学消除方法,配合高温进行消除。若内源质粒拷贝数较低可选择高压电穿孔、原生质体形成与再生法或者直接采用转座子方法,以质粒为靶标进行操作。如内源质粒序列已知,可选择质粒不相容性方法。至今为止,质粒消除方法虽有大量文献报道,仍缺少一种可用于各种细菌质粒消除的技术。质粒消除原理、菌株特征和质粒消除条件与消除效率之间的关系将是今后研究的主要方面。

参考文献

[1] Driss F, Tounsi S, Jaoua S. Relationship between plasmid loss and gene expression in *Bacillus thuringiensis*.

Current Microbiology, 2011, 62:1287-1293.

- [2] 盛祖嘉. 微生物的遗传学实验. 北京: 北京人民出版社, 1982: 56.
- [3] Leavitt A, Chmelnitsky I, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65: 243-248.
- [4] Ghosh S, Mahapatra NR, Ramamurthy T, Banerjee PC. Plasmid curing from an acidophilic bacterium of the genus *Acidocella*. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 183 (2): 271-274.
- [5] Smith K, Youngman P. Use a new integrational vector to investigate compartment-specific expression of the *Bacillus subtilis* spoIIM gene. *Biochimie*, 1992, 74: 705-711.
- [6] Dower WJ, Hiller JF, Ragsdale C. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 6127-6145.
- [7] Heery DM, Powel R, Gannon F, Dunican LK. Curing of a plasmid from *E. coli* using high-voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17 (23): 10131.
- [8] Novick R, Sanchez-Rivas C, Gruss A, Edelman I. Involvement of the cell envelope in plasmid maintenance: plasmid curing during the regeneration of protoplasts. *Plasmid*, 1980, 3 (3): 348-358.
- [9] Berzin V, Kiriukhin M, Tyurin M. "Curing" of plasmid DNA in acetogen using microwave or applying an electric pulse improves cell growth and metabolite production as compared to the plasmid-harboring strain. *Archives of Microbiology*, 2013, 195 (3): 181-188.
- [10] Spengler G, Molnár A, Schelz Z, Amaral L, Sharples D, Molnár J. The mechanism of plasmid curing in bacteria. *Current Drug Targets*, 2006, 7: 823-841.
- [11] Molnár J. Antiplasmid activity of tricyclic compounds. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 1988, 10 (7): 467-474.
- [12] Molnár J, Földeák S, Nakamura MJ, Rausch H, Domonkos K, Szabó M. Antiplasmid activity: loss of bacterial resistance to antibiotics. *APMIS Supplement*, 1992, 30: 24-31.
- [13] Molnár J, Mándi Y, Földeák S. Drug-receptor interaction on plasmid elimination by phenothiazines and imipramine in *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 1982, 29 (1): 17-25.
- [14] Molnár J, BathóN, Csik V, Chevalier J, Cremieux A. Interaction between tricyclic psychopharmacons and some

- antibiotics. Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 1995, 42: 277-285.
- [15] Mathema VB, Thakuri BKC, Sillanpää M, Shrestha RA. Study of mercury (II) chloride tolerant bacterial isolates from Baghmata River with estimation of plasmid size and growth variation for the high mercury (II) resistant *Enterobacter* spp.. *Journal of Biotechnology Research*, 2011, 3:72-77.
- [16] Zaman M, Pasha M, Akhter M. Plasmid curing of *Escherichia coli* with ethidium bromide, sodium dodecyl sulfate and acridine orange. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 2010, 27 (1) : 28-31.
- [17] Yeldho D, Rebello S, Jisha MS. Plasmid-mediated biodegradation of the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate, by *Pseudomonas aeruginosa* S7. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2011, 86:110-113.
- [18] Hintermann G, Cramer R, Vöggtli M, Hütter R. Streptomycin sensitivity by *Streptomyces glaucescens* is due to deletions comprising the structural gene coding for a specific phosphotransferase. *Molecular Genetics and Genomics*, 1984, 196: 513-520.
- [19] Hraota Y. Effect of acridine dyes on mating type factors in *E. coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1960, 46: 57-64.
- [20] Akinjogunla OJ, Enabulele IO. Virulence Factors, Plasmid profiling and curing analysis of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and Coagulase negative *Staphylococcus* spp. isolated from patients with acute otitis media. *American Journal of Science*, 2010, 6 (11) : 1022-1033.
- [21] Nakamura H, Suganuma A, Greenberg J. Effect of inorganic phosphate on acridine inhibition and plasmid curing in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 1975, 91: 45-52.
- [22] Karthikeyan V, Santosh SW. Comparing the efficacy of plasmid curing agents in *Lactobacillus acidophilus*. *Beneficial Microbes*, 2010, 1 (2) : 155-158.
- [23] Lou K, Ban R, Zhao X. Plasmid curing in bacteria. *Microbiology China*, 2002, 29 (5) : 99-103. (in Chinese)
娄凯, 班睿, 赵学明. 细菌质粒的消除. 微生物学报, 2002, 29 (5) : 99-103.
- [24] Brandi L, Falconi M, Ripa S. Plasmid curing effect of trovafloxacin. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 184: 297-302.
- [25] Lavanya B, Sowmiya S, Balaji S, Muthuvelan B. Plasmid profiling and curing of *Lactobacillus* strains isolated from fermented milk for probiotic applications. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2011, 3 (2) : 95-101.
- [26] Beg AZ, Ahmad I, Effect of *Plumbago zeylanica* extract and certain curing agents on multidrug resistant bacteria of clinical origin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, 16: 841-844.
- [27] Zhang D, Dang X, Li X, Sun X, Yang S. Progress in herbal plasmid curing agents. *Zhongguo Yuanyi Wenzhai*, 2010, 8: 191-193. (in Chinese)
张登山, 党晓林, 李晓琴, 孙晓亮, 杨思霞. 植物药质粒消除剂的研究进展. 中国园艺文摘, 2010, 8: 191-193.
- [28] Lou K, Ban R, Zhao XM. Curing of the *Bacillus subtilis* plasmid using sodium dodecyl sulfate. *Transactions of Tianjin University*, 2002, 8 (3) : 148-151.
- [29] Barreto EF, Stralioetto R, Baldani JI. Curing of a non-symbiotic plasmid of the *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 affected nodule occupancy and competitiveness of the bacteria in symbiosis with common beans. *European Journal of Soil Biology*, 2012, 50: 91-96.
- [30] Imre A, Olasz F, Kiss J, Nagy B. A novel transposon-based method for elimination of large bacterial plasmids. *Plasmid*, 2006, 55: 235-241.
- [31] Crosa JH, Hodges LL, Schiewe MH. Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity*, 1980, 27 (3) : 897-902.
- [32] Ni B, Du Z, Guo Z, Zhang Y, Yang R. Curing of four different plasmids in *Yersinia pestis* using plasmid incompatibility. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 47: 235-240.
- [33] Wang HG, Liu XK, Feng EL, Zhu L, Wang DS, Liao XR, Wang HL. Curing the plasmid pXO2 from *Bacillus anthracis* A16 using plasmid incompatibility. *Current Microbiology*, 2011, 62: 703-709.
- [34] Liu XK, Wang DS, Wang HG, Feng EL, Zhu L, Wang HL. Curing of plasmid pXO1 from *Bacillus anthracis* using plasmid incompatibility. *PLoS One*, 2012, 7 (1) : e29875.
- [35] Cao MF, Geng WT, Liu L, Song CJ, Xie H, Guo WB, Jin YH, Wang SF. Glutamic acid independent production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 and cloning of *pgsBCA* genes. *Bioresource Technology*, 2011, 102: 4251-4257.

[36] Geng WT, Cao MF, Song CJ, Xie H, Liu L, Yang C, Feng J, Zhang W, Jin YH, Du Y, Wang SF. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* LL3,

which exhibits glutamic acid-independent production of poly- γ -glutamic acid. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193: 3393-3394.

Progress in endogenous plasmid curing of bacteria— A review

Jun Feng, Wei Zhang, Cunjiang Song*

Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology for Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: To investigate the functions of the bacteria endogenous plasmid, which include bacterial drug resistance, symbiosis, capsular formation and heavy metal resistance, the endogenous plasmid needs to be cured first. We reviewed physical, chemical and molecular biological methods of endogenous plasmid curing, clarified the curing principles. The prospective of research on plasmid curing was also discussed, based on our own studies.

Keywords: plasmid curing, curing methods, curing mechanisms

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2012CB725204), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA021505) and by the National Natural Science Foundation of China (31070039, 31170030, 51073081)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-23503866; E-mail: songcj@nankai.edu.cn

Received: 28 April 2013/Revised: 4 June 2013

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2013 年 11 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊 6 年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008 - 2012	月刊	48 - 52	1 - 12
2013	月刊	53	1 - 11