·论　　著·

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 PBP2a 的原核表达及多克隆抗体的制备*

金　姝[1]，朱祖怀[1]，闫佩毅[1]，邹玉涵[1]，朱　元[1]，黄德魁[2]，朱晴晖[1]
（上海市普陀区人民医院：1. 检验科；2. 心内科　200060）

摘　要：目的　研究耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）青霉素结合蛋白 2a（PBP2a）的原核表达，及 PBP2a 多克隆抗体的制备。**方法**　根据基因文库登录的 mecA 基因的编码序列，设计合成了 1 对寡核苷酸引物，应用 PCR 法从 MRSA 基因组中获得编码 PBP2a 全长的 DNA，将此目的基因片段克隆至 pET32a（＋）载体，转化 E. coli BL21（DE3）；经异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷（IPTG）诱导表达后，利用 Ni^{2+} 亲和层析技术纯化目的蛋白；用目的蛋白免疫小鼠 3～8 次后，收获血清并鉴定。**结果**　成功构建了 PBP2a 原核表达载体，并获得了高效表达；利用纯化的蛋白制备了理想的多克隆抗体。**结论**　利用分子克隆技术，获得了高纯度的 PBP2a 蛋白并制备了多克隆抗体，为其进一步研究奠定了基础。

关键词：葡萄球菌，金黄色；　青霉素结合蛋白质类；　原核表达
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.001　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2012)01-0001-03

Prokaryotic expression of PBP2a of methicillin resistant staphylococcus aureus and preparation of its polyclonal antibody*

Jin Shu[1], *Zhu Zuhuai*[1], *Yan Peiyi*[1], *Zou Yuhan*[1], *Zhu Yuan*[1], *Huang Dekui*[2], *Zhu Qinghui*[1]
(1. *Department of Clinical Laboratory*; 2. *Department of Cardiovascular Medicine*, *Shanghai People's Hospital of Putuo District*, 200060, *China*)

Abstract: Objective　To express the PBP2a of methicillin resistant staphylococcus aureus, and prepare its polyclonal antibody. **Methods**　According to the sequence of mecA gene published on GenBank, primers were designed and synthesized. The full length of mecA gene was obtained by PCR, and then the gene was cloned into pET32a（＋）plasmid, and the recombinant plasmid was transformed into E. coli BL21(DE3). The expression was induced by IPTG and the expressed product was purified by Ni^{2+} affinity chromatography. Mice were immuned with the purified protein for 3 to 8 times, and mice serum was collected for identification. **Results**　The recombinant expression vector for PBP2a was constructed successfully, and PBP2a protein was highly expressed in prokaryotic expression system. The purified protein was used to prepare polyclonal antibody. **Conclusion**　Using molecular cloning technology, purified PBP2a protein can be obtained and prepare its polyclonal antibody, which establishes the foundation for further investigation.

Key words: staphylococcus aureus;　penicillin-binding proteins;　prokaryotic expression

由于广谱抗菌剂的广泛应用，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）在临床分离的葡萄球菌中的比例不断增加，已发展成为医院内严重感染的主要病原菌之一[1-2]。自 1961 年初首次发现 MRSA 以来，MRSA 的感染正以惊人的速度在全世界范围内蔓延和流行。因此，临床标本中 MRSA 的快速检测具有重要的意义[3]。目前研究表明，MRSA 产生的主要原因是金黄色葡萄球菌产生一种青霉素结合蛋白（PBP2a）。这种蛋白由耐药基因 mecA 编码，长 668 aa，存在于细胞表面，对 β-内酰胺类抗菌剂有极低的亲和力，其相对分子质量为 78×10^3[4]。该蛋白由 N2 末端跨膜区、非青霉素结合区和转肽酶区三部分组成，其中转肽酶区内含低亲和力的 β-内酰胺类抗菌剂作用位点，是 PBP2a 行使其主要功能即转肽酶功能的区域。由于 PBP2a 具有对 β-内酰胺类的低亲和性，因而在 β-内酰胺类存在的情况下，当其他的 PBP 均被抑制不能发挥正常生理功能时，PBP2a 则不被抑制，能够代替其他被抑制的 PBP 发挥作用，使细菌细胞得以生存而产生耐受性[5]。本研究运用 PCR 法获取了本院 MRSA 临床分离株的 mecA 基因全长，克隆至原核表达载体，并将 PBP2a 蛋白在大肠杆菌中进行了高效表达，用纯化后的蛋白作为抗原免疫小鼠制备了 PBP2a 多克隆抗体，为该蛋白检测试剂的研究奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株　MRSA 临床分离株于甘油培养基中－70 ℃保存。E. coli $DH_{5\alpha}$、BL21(DE3)工程菌由本室保存。

1.1.2　载体与主要试剂　pGEM-T Easy 载体、T_4 连接酶购于美国 Promega 公司；凝胶回收 DNA 试剂盒购于德国 QIAGEN 公司；Taq 酶、三磷酸脱氧核糖核苷（dNTP）及 BamH Ⅰ、EcoR Ⅰ等限制性核酸内切酶购自宝生物公司；G^+ 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自博大泰克；蛋白酶 K 购自 Merek 公司；Muller-Hinton 琼脂培养基粉购自 BioMériex 公司；pET32a（＋）载体和 Ni^{2+} 亲和层析柱购于 Novagen 公司；IPTG 购自 Sigma 公司；1 kb λDNA 梯度标记物购自上海生工生物工程有限公司；辣根过氧化物（HRP）标兔抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司；ECL 显色试剂购自 Thermo 公司。

1.1.3　引物　根据已公布的 mecA 序列，由上海生工生物工程有限公司合成一对寡核苷酸引物，上、下游分别引入了限制性内切酶 BamH Ⅰ、EcoR Ⅰ的识别序列和保护性碱基。上游引物：5′-CTG GAT CCA TGA AAA AGA TAA AAA ATT GTT CCA C-3′；下游引物：5′-CGG AAT TCT TAT TCA TCT ATA TCG TAT TTT TTA TTA C-3′。

*　基金项目：上海市普陀区科技自主创新资助项目（PTKW08-B01）。

1.2　方法

1.2.1　mecA 基因的 PCR 扩增　将 MRSA 临床分离株分别接种新鲜 LB 培养基，取静置培养 12 h 的菌液 1.5 mL，13 000 g离心 5 min，弃净上清液，细菌沉淀用 G^+ 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA，冻存于－80 ℃待用。

1.2.2　mecA 基因 PCR 条件及产物鉴定　反应条件：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 60 s，45 ℃退火 60 s，72 ℃延伸 3 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。取反应产物 10 μL，在 1.0%琼脂糖凝胶中，在 90 V 电压下电泳 60 min，凝胶成像系统成像分析。

1.2.3　重组质粒的构建及鉴定　MRSA 临床分离株的 PCR 产物分别用凝胶回收试剂盒回收，与 pGEM-T Easy 连接，转化 $DH_{5\alpha}$ 菌，用 AIX（含有 0.1 mg/mL 氨苄西林，0.1 mg/mL IPTG，0.02 mL X-gal）LB 平板筛选蓝白斑，提取白斑的质粒 DNA，用 BamH Ⅰ及 EcoR Ⅰ酶切鉴定，筛选阳性克隆 pGEM-T Easy-mecA。阳性克隆载体送上海生工生物工程有限公司测序，测定插入片段的序列，并与 GenBank 中登录的 mecA 序列进行比较。

1.2.4　mecA 基因原核表达载体的构建　将测序正确的 pGEM-T Easy-mecA 载体经 BamH Ⅰ/Xho Ⅰ双酶切后，回收的 mecA 基因片段与同样酶切的 pET-32a（＋）载体连接，转化 BL21（DE3）菌，用含有 0.1 mg/mL 氨苄西林的 LB 平板培养过夜。

1.2.5　诱导表达　将新鲜转化菌 BL21（DE3）单个克隆挑至 5 mL 含有 0.1 mg/mL 氨苄西林的 2×YT 液体培养基，37 ℃ 250 r/min 震荡培养过夜至饱和。次日以 1∶100 比例接种 10 mL 2×YT 液体培养基，37 ℃ 250 r/min 震荡培养 3 h 后，加 1 mmol IPTG，诱导 5 h 后，终止培养，同时设 pET32 空载体菌诱导组，取细菌沉淀经 2×十二烷基磺酸钠（SDS）菌体裂解液裂解后，十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）电泳。考马斯亮蓝 R250 染色 2 h 后脱色过夜。

1.2.6　mecA 原核表达产物的可溶性分析　将 1 mL 上述诱导的细菌经磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤后，超声波裂解（40 W×10 min），10 000 r/min×5 min，分别收获上清液和沉淀，等量上样，SDS-PAGE 电泳，观察上清液和细胞沉淀 mecA 产物的含量。

1.2.7　mecA 原核表达条件优化　新鲜培养的重组菌以 1∶100 比例接种 10 mL 2×YT 液体培养基，37 ℃ 200 r/min 震摇 3 h 后，分别加 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.80、1.00 mmol/L IPTG，诱导 5 h 后，终止培养，等量上样，SDS-PAGE 电泳，观察产量，进行表达量的优化。

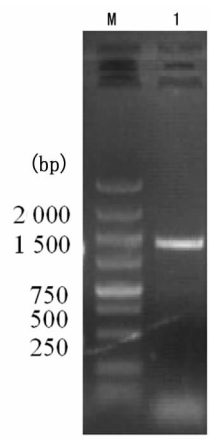
1.2.8　PBP2a 蛋白的纯化　取含 pET-32a（＋）-mecA 表达质粒的 E. coli BL21（DE3）于含氨苄西林（100 mg/L）2×YT 培养液中 37 ℃ 250 r/min，震摇至 $A_{600}=0.6$，加 IPTG（终浓度为 1.0 mmol/L）于 37 ℃继续震摇培养 5 h，离心收集菌体，8 mol/L 的尿素变性后，过 Ni^{2+} 亲和层析柱，用含 5、250、500 mmol/L 咪唑的变性裂解缓冲液洗脱，以 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白相对分子质量及纯度，并采取逐步降低尿素浓度梯度复性法复性，离心取上清液，PEG（2000）浓缩后备用。

1.2.9　小鼠多抗的制备和检测　50 μg 纯化的重组蛋白腹腔免疫 6 周龄 Balb/c 小鼠，10 天/次，免疫 3～8 次后采血，分离血清。

1.2.10　Western blot 鉴定抗体的特异性　利用免疫制备的高免血清，对 mecA 的原核表达产物进行 Western blot 检测，具体方法：将诱导表达的重组菌裂解产物上清液经 12%浓度的胶 SDS-PAGE 电泳分离，0.65 mA/cm^2 电流转印 NC 膜 2 h，用 5%脱脂乳封闭过夜，TBST 洗涤，多抗血清的稀释倍数均为 1∶400，二抗为 HRP 酶标羊抗鼠 IgG（工作浓度 1∶10 000），以 ECL 显色。

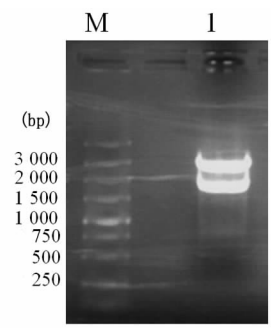
2　结　　果

2.1　mecA 基因全长的获取　用 PCR 方法从 MRSA 临床分离株中获得 mecA 基因的全长（mecA 基因全长 2 007 bp，引物中带有长 16 bp 的酶切位点），见图 1。



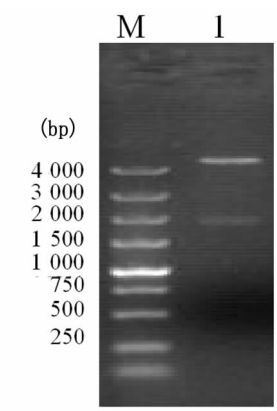
M：DNA 标准；1：PCR 产物。

图 1　PCR 扩增 mecA 基因全长



M：DNA 标准；1：BamH Ⅰ和 EcoR Ⅰ双酶切重组质粒。

图 2　pGEM-T Easy-mecA 重组质粒的酶切鉴定



M：DNA 标准；1：BamH Ⅰ和 EcoR Ⅰ双酶切重组质粒。

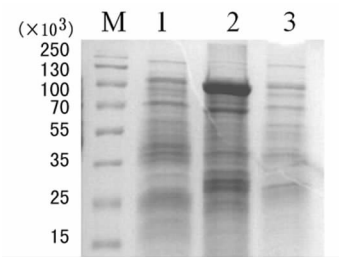
图 3　pET-32a-mecA 重组质粒的酶切鉴定

2.2　PCR 产物克隆至 pGEM-T Easy 载体　将上述 PCR 产物经切胶纯化后，连接 pGEM-T Easy 载体，转化 $DH_{5\alpha}$ 细菌，挑

取平板中单菌落白斑，转接种 LB 液体培养基，12 h 后提取质粒 DNA，用 BamH Ⅰ 和 EcoR Ⅰ 双酶切，可见 2 000 bp 左右的目的基因片段和 3 000 bp 左右的载体片段，见图 2。

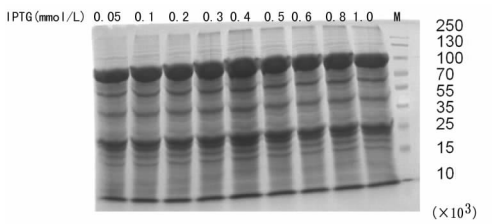
2.3 pGEM-T Easy-mecA 载体的测序　重组载体阅读框完整，碱基序列翻译后的氨基酸序列与 GeneBank NC 009782 比较有如下变异：Glu64Gly、Asn146Lys、Asn204Lys、Ile465Asp，同源性达 99.4%。

2.4 重组表达载体 pET-32a-mecA 载体的构建　将测序完全正确的 pGEM-T Easy-mecA 载体分别用 BamH Ⅰ 和 EcoR Ⅰ 双酶切，与相同酶切的 pET32a(+)载体 DNA 连接，转化 $DH_{5\alpha}$，挑取细菌，提取质粒 DNA，相同酶切鉴定出含插入片段(约 2 000 bp)的重组质粒，命名为：pET-32a-mecA，见图 3。



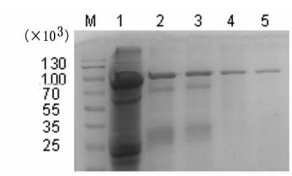
M：标准蛋白；1：空载体转化菌；2：IPTG 诱导重组质粒转化菌超声裂解后包涵体沉淀；3：IPTG 诱导重组质粒转化菌超声裂解后上清液。

图 4　重组蛋白的表达



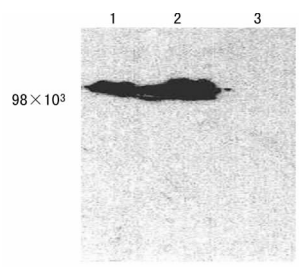
M：标准蛋白。

图 5　重组蛋白的表达条件的优化



M：标准蛋白；1：IPTG 诱导重组质粒转化菌(洗脱前)；2：5 mmol 咪唑洗脱；3：250 mmol 咪唑洗脱；4、5：500 mmol 咪唑洗脱。

图 6　重组蛋白 PBP2a 的纯化



1：IPTG 诱导重组质粒转化菌；2：经 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化后的蛋白；3：空载体转化菌。

图 7　多克隆抗体 Western blot 分析

2.5 重组蛋白 PBP2a 的诱导表达及条件的优化　表达产物主要存在于包涵体沉淀中，见图 4，融合蛋白的相对分子质量大小约 98×10^3。不同 IPTG 浓度均能诱导融合蛋白高效表达，见图 5。

2.6 重组蛋白 PBP2a 的纯化　重组蛋白经 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化后，可见 98×10^3 处有清晰条带，见图 6，基本未见杂蛋白带。

2.7 Western blot 分析 PBP2a 多克隆抗体的特异性　空载体菌体蛋白无杂交条带，而重组蛋白在纯化前、后均出现了一条杂交条带，表明多克隆抗体具有较高的特异性，见图 7。

3　讨　论

目前，快速检测 MRSA 的商品化试剂有荧光 PCR 法检测 mecA 基因和乳胶凝集法检测 PBP2a[6-8]。PCR 法检测耐药基因 mecA，在部分 MRSA 中，由于 mecA 基因启动子突变，不表达 mecA 基因产物 PBP2a，若仅检测 mecA 基因鉴定 MRSA，有时会得出假耐药的结论[9]。乳胶凝集法可检测 PBP2a 蛋白，但该检测试剂为进口产品，价格昂贵，限制了其进一步广泛推广和应用[8]。自行研制用于检测 PBP2a 试剂的首要前提是有高纯度的 PBP2a 蛋白和特异的单克隆抗体，在制备单克隆抗体之前先行制备多克隆抗体用于蛋白的鉴定及单抗筛选时的阳性对照，为进一步制备单克隆抗体奠定了基础。

目前，尚无原核表达 PBP2a 全长的报道，本研究采用全长蛋白作为抗原免疫小鼠，最大限度地保留了潜在的免疫原位点，为多克隆抗体和单克隆抗体的制备提供了坚实的基础。mecA 基因的全长插入表达载体 pET-32a 可以获得高效表达，经条件优化确定在 A_{600} 为 0.6 时加入终浓度 0.05～1.00 mmol/L 的 IPTG，37 ℃震摇培养 5 h 时 PBP2a 融合蛋白表达量最高。经 pET-32a 载体表达的 PBP2a 以包涵体形式存在，为获得可溶性的 PBP2a 蛋白用于抗体的制备，涉及包涵体的溶解和复性，由于蛋白质复性十分复杂，通常包涵体蛋白复性率很低，不超过 20%[10]。本研究拟检测的对象为经蛋白变性试剂处理后的 PBP2a 蛋白，因此，用无生物学活性的原核表达蛋白质作为免疫原并无不妥。本实验发现，PBP2a 融合蛋白形成的包涵体能够溶解于 8 mol/L 的尿素溶液中，经过 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化后，再采用梯度透析的方法复性，获得了高纯度的 PBP2a 蛋白。纯化的 PBP2a 蛋白免疫小鼠 3～8 次后，获取小鼠血清，可用于鉴定 PBP2a 融合蛋白，证明了原核表达的 PBP2a 蛋白具有抗原性，并获得了特异的 PBP2a 多克隆抗体。PBP2a 融合蛋白的成功表达、纯化和多克隆抗体的制备，为其单克隆抗体的制备和 PBP2a 蛋白的检测奠定可靠基础。

参考文献

[1] Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, et al. Vancomycin-resistant staphylococcus aureus in the United States, 2002－2006[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(5): 668-764.

[2] 刘德华，胡大春，马婷. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 6 年发生率及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志，2010，31(11)：1253-1255.

[3] Lee AS, Huttner B, Harbarth S. Control of methicillin-resistant staphylococcus aureus[J]. Infect Dis Clin North Am, 2011, 25(1): 155-179.

[4] Cataldo MA, Taglietti F, Petrosillo. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a community health threat[J]. N Postgrad Med, 2010, 122(6): 16-23.

[5] Ender M, Berger-Bächi B, McCallum N. A novel DNA-(下转第 6 页)

部分，以微机械电子系统技术为依托，在石英、玻璃、塑料等基片上刻蚀出微管道网络和其他的功能单元，形成进样、反应、分离、检测于一体的快速、高效、低耗的微型分析装置，使传统毛细管电泳分离物质的整个过程可以在一块几平方厘米的基片上得以实现。高分子材料具有种类多、可选择余地大、加工成型方便、加工便宜等优点，非常适合于大批量制作一次性微流控芯片。PDMS 具有能可逆和重复变形而不发生永久性破坏、可高保真、无毒、价廉等特点，已广泛地应用于制备微流控分析芯片[8]。尽管 PDMS 具有以上特点，但其壁面具有很强疏水性，易使核酸、蛋白等物质强烈吸附[9]，不利于电泳分离。因此，研究一种简单的表面修饰方法，有效消除分析物质在 PDMS 壁面的吸附是本研究拟解决的关键问题。

本文选择 DDM 和 HPC 有效消除 PDMS 微通道上分析物质吸附和抑制电渗流。DDM 为非离子型表面活性剂，能吸附在疏水表面并形成单分子层[10]。HPC 作为 PDMS 微流控芯片用于 DNA 片段电泳分离的筛分介质。不同浓度的 HPC 作为改性剂，HPC 是具有壁面吸附能力的亲水性高分子，当加入低浓度 HPC 时（≤0.75%），可有效地改变 PDMS 壁面的疏水性，使得电泳缓冲液更加容易灌入管道。当加入较高浓度 HPC（≥1.5%），HPC 分子链相互缠绕，使得电泳具有筛分的能力，可以应用于 DNA 片段的分离分析。如图 3、4 所示，PDMS 微流控芯片电泳分离 DNA 获得良好重现性，并可用于线粒体疾病患者 PCR 多重产物的检测。微流控芯片电泳的结果与传统琼脂糖凝胶电泳结果相一致，但此法比琼脂糖凝胶电泳操作简单、分析速度快，适合临床常规分析。

血清低密度脂蛋白（LDL）颗粒在大小、密度和脂质组成上具有异质性。根据颗粒相对大小，LDL 一般分为 A、B 两型，A 型为较大颗粒，是大而轻低密度脂蛋白（lLDL），颗粒较小的 B 型即小而密低密度脂蛋白（sdLDL），是动脉粥样硬化发生的强危险因素，与冠心病的形成密切相关[11-12]。近年来，sdLDL 与冠心病的关系越来越受到人们关注，但尚缺乏简易 LDL 亚组分分析的方法。李健斋和王抒[13]提出以 ApoB 测定评估 sdLDL 水平的设想，建议 LDL-C 与 ApoB 同时测定并结合 TG 水平用于估计 LDL 亚组分的类型。如图 5 所示，本研究建立的方法可快速、简易地测定 sdLDL，冠心病组血清中 sdLDL 检出率与健康体检组差异有统计学意义（$P<0.01$）。结果显示，基于 PDMS 微流控芯片电泳的 sdLDL 分离分析，对评价冠心病的危险因素，实现对冠心病的早期检测、预防及有效制定冠心病防治策略具有重大意义。

PDMS 微流控芯片电泳对 DNA、脂蛋白表现出来的高分辨、高速的分离分析能力，使其最有希望攻克成为蛋白组学研究、基因临床诊断、药物筛选等难题的分离分析手段之一。

参考文献

[1] Harrison DJ, Manz A, Fan ZH, et al. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip[J]. Anal Chem, 1992, 64(2): 1926-1932.

[2] Kato M, Gyoten Y, Sakai-Kato K, et al. Rapid analysis of amino acids in Japanese green tea by microchip electrophoresis using plastic microchip and fluorescence detection[J]. J Chromatogr A, 2003, 1013(1/2): 183-189.

[3] Li Y, Buch JS, Rosenberger F, et al. Integration of isoelectric focusing with parallel sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for multidimensional protein separations in a plastic microfludic network[J]. Anal Chem, 2004, 76(3): 742-748.

[4] Munce NR, Li J, Herman PR, et al. Microfabricated system for parallel single-cell capillary electrophoresis[J]. Anal Chem, 2004, 76(17): 4983-4989.

[5] 王惠民，孙承龙，王跃国，等. 微流控芯片电泳在快速分离尿蛋白中的临床应用价值[J]. 中华检验医学杂志，2004，27(9)：551-553.

[6] Wang H, Wang HM, Jin QH, et al. Microchip-based small, dense low-density lipoproteins assay for coronary heart disease risk assessment [J]. Electrophoresis, 2008, 29(9): 1932-1941.

[7] Chen JF, Jin QH, Zhao JL, et al. A signal process method for DNA segments separation in micro-channel electrophoresis[J]. Biosens Bioelectron, 2002, 17(6/7): 619-623.

[8] Duffy DC, Mcdonald JC, Schueller OJA, et al. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)[J]. Anal Chem, 1998, 70(23): 4974-4984.

[9] Linder V, Verpoorte E, Thormann W, et al. Surface biopassivation of replicated poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels and application to heterogeneous immunoreaction with on-chip fluorescence detection[J]. Anal Chem, 2001, 73(17): 4181-4189.

[10] Zhang L, Somasundaran P, Maltesh C. Adsorption of n-Dodecyl-beta-d-maltoside on solids [J]. J Colloid Interface Sci, 1997, 191(1): 202-208.

[11] 鄢盛恺. 临床血脂测定与应用[J]. 临床荟萃，2006，21(10)：685-689.

[12] Austin MA, Hokanson JE, Brunzell JD. Characterization of low-density lipoprotein subclasses: methodologic approaches and clinical relevance[J]. Current Opin Lipidol, 1994, 5(6): 395-403.

[13] 李健斋，王抒. 低密度脂蛋白、脂蛋白(a)与冠心病[J]. 中华医学检验杂志，1999，22(1)：5-8.

（收稿日期：2011-10-20）

（上接第 3 页）

binding protein modulating methicillin resistance in staphylococcus aureus [J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 15.

[6] 朱以军，李向阳. 荧光实时 PCR 法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中华医药感染学杂志，2007，17(7)：898-900.

[7] 陈弟，胡大春. 分子生物学技术检测 MRSA 的研究进展[J]. 国际检验医学杂志，2010，31(5)：475-477.

[8] 潘钦石，周铁丽，林晓梅，等. 四种方法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的结果比较[J]. 温州医学院学报，2004，34(1)：63-64.

[9] Ender M, McCallum N, Berger-Bächi B. Impact of mecA promoter mutations on mecA expression and beta-lactam resistance levels [J]. Int J Med Microbiol, 2008, 298(7/8): 607-617.

[10] 汪家政，范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京：科学出版社，2001：29-31.

（收稿日期：2011-08-27）