

网络出版时间: 2019-9-3 17:27 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1434.033.html>

金黄色葡萄球菌二元调控系统 *vraSR* 基因敲除菌株的构建及其致病性研究

高彩虹,戴媛媛,常文娇,马筱玲

摘要 利用基因敲除及基因回补技术构建异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌标准菌株(Mu3) *vraSR* 基因敲除株(Δ *vraSR*)及基因回补株(*C* Δ *vraSR*),使用小鼠皮肤脓肿形成模型研究 *VraSR* 在金黄色葡萄球菌致病性中的作用。PCR 及 RT-PCR 验证 *vraSR* 基因敲除株及其回补株构建成功。与野生株 Mu3 比较, Δ *vraSR* 菌株小鼠皮肤脓肿面积显著减小($P < 0.001$),皮肤组织荷菌量明显减低($P < 0.01$),皮肤组织病理损伤减轻。*C* Δ *vraSR* 株可以恢复致病性。*VraSR* 可增加金黄色葡萄球菌的致病性。

关键词 金黄色葡萄球菌; *VraSR*; 基因敲除; 致病性

中图分类号 R 378.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)10-1651-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.032

金黄色葡萄球菌(以下简称金葡菌)是临床常见的病原菌,能引起从皮肤软组织感染到菌血症、肺炎、心内膜炎、深部脓肿等多种感染性疾病^[1]。该菌易获得耐药性,从临床标本中分离的金葡菌约 50% 为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)^[2]。万古霉素是治疗严重 MRSA 感染的首选药物^[3],但随着临床用量增加,低水平万古霉素耐药金葡菌开始出现,包括万古霉素中介金葡菌(vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*, VISA)和异质性万古霉素中介金葡菌(heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*, h-VISA)。研究^[4]显示, h-VISA/VISA 感染的临床特点为细菌难以清除,感染症状持续存在,反复发作,给治疗带来极大困难。

VraSR (Vancomycin resistance-associated sensor regulator) 是金葡菌万古霉素耐药相关感应二元调控子。研究^[5]显示, *VraSR* 的表达水平在 h-VISA/VISA 中明显上升。附属基因调节因子(accessory

gene regulator, agr) 是金葡菌最重要的全局调控子,对毒力和生物膜均具有调控作用^[6],前期研究^[7]结果显示 *VraR* 蛋白可直接与 agr 启动子区域结合,提示 *VraSR* 可能具有广泛的调控作用。由此,该研究通过构建万古霉素异质性耐药标准菌(Mu3) *vraSR* 基因敲除株、回补株以及小鼠皮肤感染模型,探讨 *VraSR* 表达在金葡菌致病中发挥的作用,以期为基于 *VraSR* 为靶点的 h-VISA/VISA 感染诊断和干预策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和动物 异质性万古霉素中介金葡菌(Mu3)和质粒 pLI50 由安徽医科大学第一附属医院李家斌教授馈赠;金葡菌 RN4220 为限制性内切酶缺陷菌株;温度敏感型穿梭质粒 pKOR1 和大肠杆菌 DC10B 由皖南医学院朱涛博士馈赠。昆明小鼠(Kunming mice, KM 小鼠)购自安徽医科大学实验动物中心,雌性,6~8 周龄。

1.1.2 主要试剂及仪器 细菌基因组提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;氯霉素、脱水四环素、溶葡萄球菌素购自生工生物工程(上海)股份有限公司;BP Clonase™ II Enzyme Mix 购自美国 Invitrogen 公司;cDNA 合成试剂盒和 qRT-PCR 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司;万古霉素药物敏感性试纸条购自法国梅里埃公司;胰蛋白胨大豆肉汤培养基(trypsin soy broth, TSB)、LB 培养基购自英国 Oxoid 公司;Bio-Rad PCR 仪、Bio-Rad 凝胶成像仪购自美国伯乐公司;ABI7500 型荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中金葡菌 Mu3 基因组序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *vraSR* 基因上游片段引物(*vraSR*-UF、*vraSR*-UR)、下游片段引物(*vraSR*-DF、*vraSR*-DR),所设计的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。见表 1。

2019-06-03 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81772248);安徽省自然科学基金(编号: 1808085QH255)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院检验科,合肥 230001

作者简介: 高彩虹,女,硕士研究生;

马筱玲,女,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: maxiaoling@USTC.edu.cn

表1 引物序列

引物	引物序列(5'-3')	长度(bp)
<i>vraSR</i> -U	F: GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCACCCGCTGAAACATCTAC R: gatgaaccactacaatagaacAGAACACAAGCTGTCATCTATGC	994
<i>vraSR</i> -D	F: catagatgacagcttgtgtctGTTCTATTGTAGTGGTTCATCG R: GGGGACCACTTTGTACAGAAAGCTGGGTGACATCAACGAAGATACATAGC	1 181
<i>vraSR</i> -I	F: GACCTCTGTTTTTTGGTGTCTATT R: CGTAGAGGTGATTTATCGATGAAC	1 755/100
<i>vraSR</i> -C	F: G CCGGTA CCGGGAGGTTTTAAACATGAACCACTACAATAGA R: G CCGAATTC CTATTGAATTAATTATGTTGGAATGCATAGATGA	1 662

下划线分别代表 *attB1* 和 *attB2* 特异性位点; *vraSR*-UR 和 *vraSR*-DF 中小写字母为上下游同源片段之间的互补序列; 方框部分为限制性酶切位点

1.2.2 金黄色葡萄球菌 *vraSR* 基因敲除株的构建

以金黄色葡萄球菌 Mu3 基因组 DNA 为模板, 以引物 *vraSR*-UF、*vraSR*-UR 和引物 *vraSR*-DF、*vraSR*-DR 分别扩增上下游同源片段, 具体引物序列见表 1。使用融合 PCR 得到上下游序列相连的 DNA 序列。使用 Gateway BP Clonase™ II Enzyme Mix (日本 TaKaRa 公司) 试剂盒进行 PCR 产物与质粒的重组反应, 按试剂盒说明进行操作。通过 PCR 及测序鉴定重组质粒 pKOR1-*vraSR* 是否正确。从大肠杆菌 DC10B 中抽提的重组质粒 pKOR1-*vraSR* 首先电转入 (电转条件: 电压 2.5 kV, 电容 25 μ F, 电阻 100 Ω) 金黄色葡萄球菌 RN4220 中, 从金黄葡萄球菌 RN4220 抽提的重组质粒以相同条件电转入金黄色葡萄球菌 Mu3 后, 在 42 $^{\circ}$ C 含 10 μ g/ml 氯霉素的 TSB 培养基中多次传代 (4~5 次), 将菌液 10^4 倍稀释铺板到含 1 μ g/ml 脱水四环素 (ATc) 的 TSB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。挑取 50 个菌落分别接种普通 TSB 平板和含 10 μ g/ml 氯霉素的 TSB 平板, 培养过夜。选择仅在 TSB 平板上生长的克隆抽提基因组 DNA, 使用引物 *vraSR*-4F 和 *vraSR*-4R 进行 PCR 扩增初步鉴定 *vraSR* 基因是否从基因上敲除成功, 最后通过序列测定 RT-PCR 证明敲除株构建成功, 敲除株命名为 Δ *vraSR*。

1.2.3 金黄色葡萄球菌 $C\Delta$ *vraSR* 基因回补株的构建

首先构建金黄色葡萄球菌 *vraSR* 基因表达质粒, 使用表 1 中引物 *vraSR*-C-F 和 *vraSR*-C-R 扩增 *vraSR* 基因, 使用 *sac* I 和 *Kpn* I 将 *vraSR* 基因克隆到穿梭质粒 pLI50, 获得重组质粒 pLI50-*vraSR*。从大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 中抽提的重组质粒首先电转入金黄色葡萄球菌 RN4220 中, 从金黄葡萄球菌 RN4220 抽提的重组质粒再电转入 Δ *vraSR*。电转条件同 *vraSR* 基因敲除株的构建, 通过序列测定及 RT-PCR 证明回补成功。

1.2.4 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 收集对数生长期金葡菌 Mu3、 Δ *vraSR* 和 $C\Delta$ *vraSR*。利用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 按试剂盒操作说明逆转录成 cDNA, 再进行荧光定量 PCR 检测。使用的引物序列如下: *vraSR*-1 (F): 5'-TGTTGCTCTCAAAAAGTGT-TCAATA-3', *vraSR*-1 (R): 5'-CCTATTCATATTGGTT-TCGGAA-3'; 16sRNA-1 (F): 5'-CGTGCTACAATGGA-CAATACAAA-3', 16sRNA-2 (R): 5'-ATCTACGAT-TACTAGCGATTCCA-3'。以 16sRNA mRNA 表达水平作为内参, 检测各菌株中 *vraSR* 基因的表达水平。

1.2.5 小鼠皮肤脓肿模型的建立

参照文献^[8]报道的方法, 将金葡菌 Mu3、 Δ *vraSR* 和 $C\Delta$ *vraSR* 在 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 条件下培养至对数生长中期, 收集细菌后用无菌 PBS 调节菌浓度至 1×10^9 CFU/ml, 取 50 μ l 金黄色葡萄球菌在小鼠背部进行皮下注射, 每一菌株接种 5 只小鼠, 对照组接种 50 μ l PBS。1 周后将小鼠用 4% 水合氯醛麻醉后解剖观察并测量小鼠皮肤脓肿面积。

1.2.6 平板法统计皮肤组织中的荷菌数

将皮肤组织充分研磨后的组织悬液经适当稀释涂布于血琼脂平板上, 统计并计算皮肤组织中的荷菌数。

1.2.7 石蜡切片的制备

使用皮肤采样器无菌采集感染后的皮肤组织, 置于多聚甲醛固定过夜后, 按照常规组织切片的方法制备石蜡切片, 并进行 HE 染色。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数的比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Mu3 中 *vraSR* 基因敲除株 Δ *vraSR* 和基因互补株 $C\Delta$ *vraSR* 的构建

Mu3 与 *vraSR* 基因敲除株 Δ *vraSR* 基因组 DNA 以 *vraSR*-4F 和 *vraSR*-4R 为引物

的 PCR 结果见图 1A, 以 Mu3 为模板, 扩增 PCR 产物长度为 1 755 bp, 以 *vraSR* 基因敲除株 DNA 为模板, 扩增 PCR 产物长度为 100 bp。对 *vraSR* 基因敲除株进行回补后, Mu3 与 *vraSR* 基因回补株 *CΔvraSR* 基因组 DNA 以 *vraSR*-C-F 和 *vraSR*-C-R 为引物进行 PCR 扩增(图 1B), PCR 产物长度均为 1 662 bp。通过荧光定量分析 Mu3、*ΔvraSR*、*CΔvraSR* 菌株中 *vraSR* 基因的转录水平进行了确认, 在 *vraSR* 基因缺失株中 *vraSR* 基因的转录完全缺失, 对 *vraSR* 缺失株的质粒回补回复了 *vraSR* 基因的转录($t = 17.7, P < 0.001$)(图 1C)。以上结果均证明 *vraSR* 基因被敲除及回补成功。

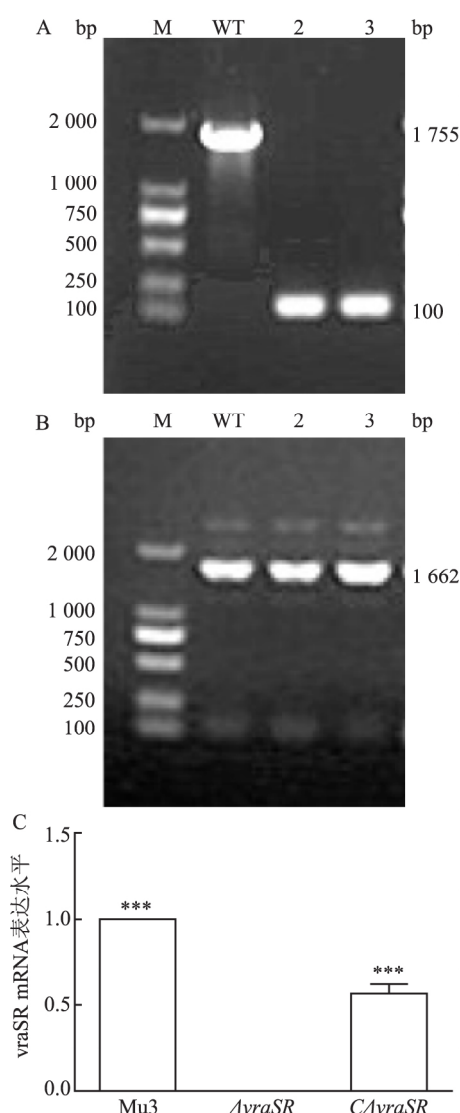


图1 构建金黄色葡萄球菌 *vraSR* 基因敲除株及回补株

A: 用 PCR 方法筛选 *vraSR* 基因敲除株; B: 用 PCR 方法筛选 *vraSR* 基因回补株; M: 2 000 bp DNA Marker; WT: 野生株 Mu3; 2 和 3: *CΔvraSR* 菌株; C: RT-PCR 检测 Mu3、*ΔvraSR*、*CΔvraSR* 菌株中 *vraSR* 基因的 mRNA 表达水平; 与 *ΔvraSR* 比较: *** $P < 0.001$

2.2 敲除 *vraSR* 基因降低金黄色葡萄球菌的致病性 与 Mu3 菌株比较, *ΔvraSR* 菌株接种小鼠后肉眼观察皮肤病变较轻, Mu3 和 *ΔvraSR* 菌株的脓肿面积分别为 $(1.58 \pm 0.31) \text{ cm}^2$ 、 $(0.71 \pm 0.15) \text{ cm}^2$ ($t = 5.634, P < 0.001$)。 *CΔvraSR* 株形成脓肿面积为 $(1.15 \pm 0.30) \text{ cm}^2$ ($t = 2.864, P < 0.05$), 表明回补 *vraSR* 基因后增加金黄色葡萄球菌致病性(图 2A、2B)。另外, 通过分析小鼠皮肤组织的菌负荷量显示, *ΔvraSR* 株接种小鼠皮肤组织菌负荷量也显著减少($t = 3.356, P < 0.01$)。回补 *vraSR* 基因后小鼠皮肤组织菌负荷量增加($t = 2.521, P < 0.05$)(图 2C)。取小鼠皮肤组织进行 HE 染色观察显示 Mu3 感染组小鼠皮肤组织病理损伤明显加重, 主要表现为显著的炎性细胞浸润; 而 *ΔvraSR* 感染组小鼠皮肤组织病理损伤较轻, 未发现明显的炎性细胞浸润。以上结果表明, Mu3 菌株中 *vraSR* 基因缺失可以明显降低金黄色葡萄球菌的致病性。

3 讨论

二元调控系统(two-component regulatory system, TCRS)是细菌中常见的信号转导系统, 也是基因表达的重要调控系统。细菌可以利用 TCRS 调节毒力、代谢、营养等一系列生理过程, 从而协助其适应外界环境, 在细菌的致病性中发挥重要作用^[8]。 *VraSR* 是一种与万古霉素耐药相关的二元调控系统, 在 VISA/hVISA 中高表达^[9]。然而, 目前对 *VraSR* 的研究均集中在耐药调控方面, 其在金黄色葡萄球菌致病性中的作用尚未见报道。

本课题组采用 pKOR1 和 pLI50 为载体, 分别构建金黄色葡萄球菌 *vraSR* 基因敲除株及其回补株, 并利用 RT-PCR 验证构建成功。pKOR1 质粒的结构特点是有用于 lambda 重组的位点(*attP1*、*attP2*), 可快速构建同源重组质粒, 无需人为导入抗生素抗性基因, 可避免影响其他基因功能。质粒 pKOR1 的另一个特点是在脱水四环素诱导条件下可表达 *secY* 的反义 RNA, *secY* 是葡萄球菌的必须基因, 因此整合了该质粒的菌株将无法存活^[10]。由于以上特点, 采用质粒 pKOR1 可以极大地提高目的基因的敲除效率。

VraSR 是万古霉素耐药相关二元调控系统, 由组氨酸激酶 *VraS* 和反应调控蛋白 *VraR* 两个部分组成。研究^[11]显示 *VraSR* 可感受外界压力变化, 参与细胞壁调节。细胞壁是包被于细菌细胞最外侧具有坚韧性和弹性的复杂结构。金黄色葡萄球菌细胞壁的主要成

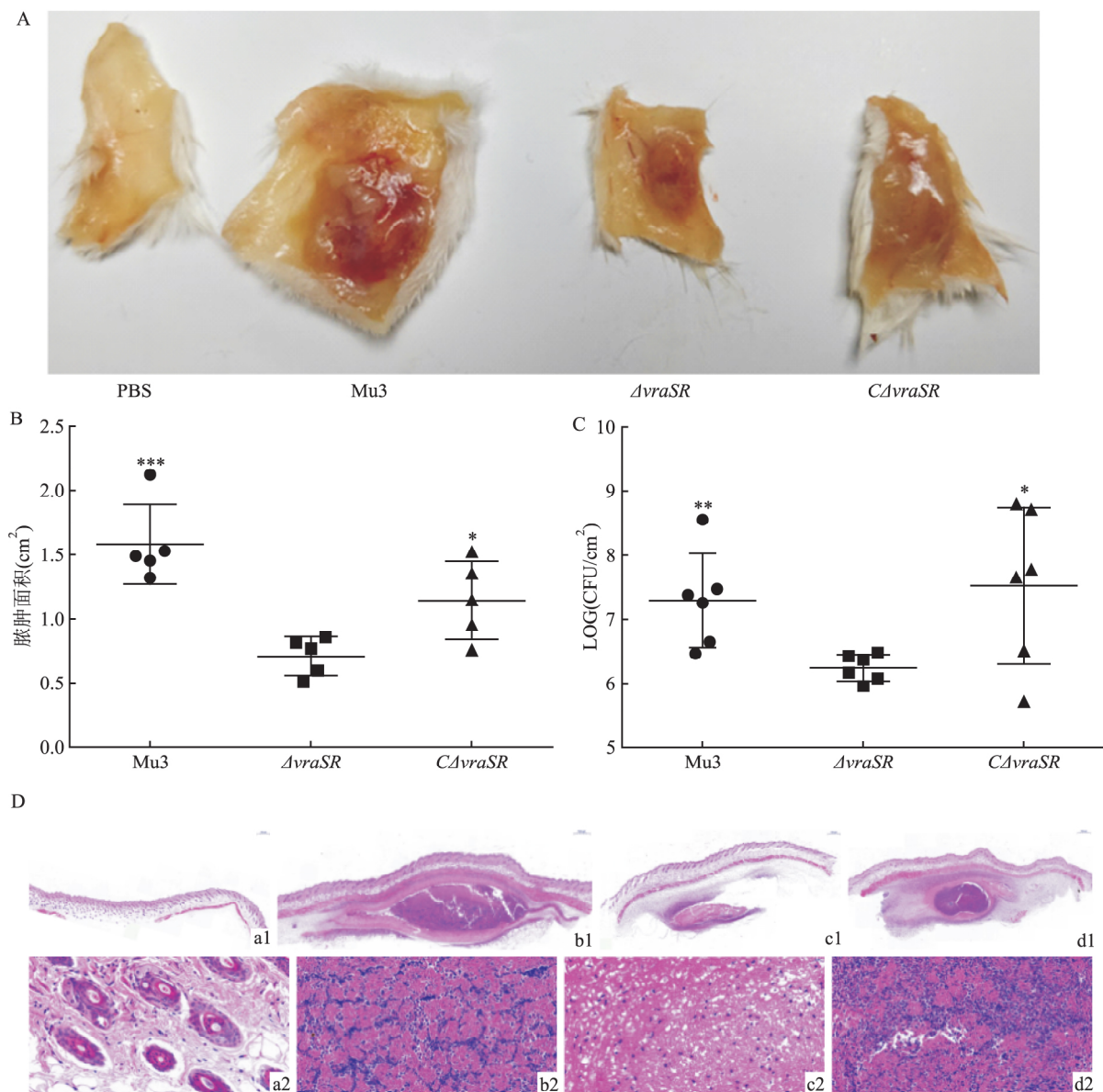


图2 小鼠皮肤脓肿形成

A: 小鼠皮肤感染大体标本; B: 小鼠脓肿面积大小; C: 小鼠皮肤组织菌负荷量; 与 $\Delta vraSR$ 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; D: 各组小鼠皮肤组织 HE 染色; a: 生理盐水组; b: Mu3 菌株组; c: $\Delta vraSR$ 菌株组; d: $C\Delta vraSR$ 菌株组; 1: $\times 2$; 2: $\times 40$

分包括肽聚糖、脂磷壁酸、壁磷壁酸及脂蛋白。这些胞壁成分常在宿主免疫系统针对金葡菌感染产生多种趋化因子和细胞因子的过程中发挥作用。有研究^[12]显示缺乏壁磷壁酸的菌株对内皮细胞的吸附性明显降低,与动物心内膜炎模型中金葡菌毒力降低有关。另有报道称脂磷壁酸能够激发中性粒细胞释放细胞因子^[13],而肽聚糖与脂磷壁酸协同作用可在体内引发炎症反应^[14]。研究^[11]显示 *vraSR* 在保持细胞壁肽聚糖完整性上发挥重要作用,缺失 *vraSR* 基因的菌株细胞壁合成能力明显降低。本实验通过 HE 染色检测小鼠皮肤组织病理变化,结果

表明, $\Delta vraSR$ 感染组小鼠皮肤组织炎性浸润显著降低。

本课题组前期研究^[7]表明 *VraR* 蛋白可以直接与 *agr* 启动子区域结合。*agr* 是金葡菌中研究最多也最为透彻的二元调控系统,可调节胞外蛋白毒素及细胞表面相关蛋白的表达^[8]。*agr* 调控可以使金葡菌从感染的定植阶段向感染后期入侵、获取宿主营养物质阶段过渡^[15]。由此推测 *VraSR* 可能通过 *agr* 间接参与金葡菌毒力调控。毒力是决定细菌致病力的关键因素。本研究采用小鼠皮肤脓肿模型证实敲除 *vraSR* 基因后,金葡菌的致病性显著下降。

综上所述,敲除金葡萄菌 *vraSR* 基因可以明显降低金葡萄菌皮肤脓肿的形成及炎症反应,证实 *VraSR* 在金葡萄菌的致病性中发挥重要作用。*VraSR* 通过何种途径调节金葡萄菌致病性,其机制是否与 *agr* 调控系统及细胞壁合成相关需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Dayan G H, Mohamed N, Scully I L, et al. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention [J]. Expert Rev Vaccines, 2016, 15(11): 1373 – 92.
- [2] Mostofsky E, Lipsitch M, Regev-Yochay G. Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* replacing methicillin-susceptible *S. aureus*? [J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(10): 2199 – 214.
- [3] Hu Q, Peng H, Rao X. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1601.
- [4] Maor Y, Hagin M, Belausov N, et al. Clinical features of hetero-resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia versus those of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia [J]. J Infect Dis, 2009, 199(5): 619 – 24.
- [5] Howden B P, Smith D J, Mansell A, et al. Different bacterial gene expression patterns and attenuated host immune responses are associated with the evolution of low-level vancomycin resistance during persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia [J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 39.
- [6] Le K Y, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci – an overview [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 1174.
- [7] Dai Y, Chang W, Zhao C, et al. *VraR* binding to the promoter region of *agr* inhibits its function in VISA/h-VISA [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, doi: 10. 1128 / AAC. 02740 – 16.
- [8] 杜 昕,宋 燕,胡锦涛,等. 新的细胞壁锚定蛋白 SasX 对金黄色葡萄球菌生物膜形成和毒力的影响 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(12): 1087 – 92.
- [9] Stock A M, Robinson V L, Goudreau P N. Two-component signal transduction [J]. Annu Rev Biochem, 2000, 69: 183 – 215.
- [10] Bae T, Schneewind O. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection [J]. Plasmid, 2006, 55(1): 58 – 63.
- [11] Kuroda M, Kuroda H, Oshima T, et al. Two-component system *VraSR* positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus* [J]. Mol Microbiol, 2010, 49(3): 807 – 21.
- [12] Weidenmaier C, Peschel A, Xiong Y Q, et al. Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis [J]. J Infect Dis, 2005, 191(10): 1771 – 7.
- [13] Deininger S, Stadelmaier A, von Aulock S, et al. Definition of structural prerequisites for lipoteichoic acid-inducible cytokine induction by synthetic derivatives [J]. J Immunol, 2003, 170(8): 4134 – 8.
- [14] Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation [J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(3): 171 – 9.
- [15] Haag A F, Bagnoli F. The role of two-component signal transduction systems in *Staphylococcus aureus* virulence regulation [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2017, 409: 145 – 98.

Research of construction and pathogenicity of *vraSR* two-component regulatory system knockout strain of *S. aureus*

Gao Caihong, Dai Yuanyuan, Chang Wenjiao, et al

(Dept of Laboratory Medicine, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Using gene knockout and gene complementation technology to construct heterogeneous vancomycin-mediated *Staphylococcus aureus*(Mu3) *vraSR* gene deletion mutant(Δ *vraSR*) and gene complement strain(*C* Δ *vraSR*) , and to probe the effect of *VraSR* on the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* by mouse skin abscess formation model. The successful construction of *vraSR* gene deletion mutant strain and gene complement strain was verified by PCR and RT-PCR. Compared with the wild strain Mu3, the skin abscess of the Δ *vraSR* strain mice was significantly reduced($P < 0. 001$) , the amount of skin tissue bacteria was significantly reduced($P < 0. 01$) , and the pathological damage of the skin tissues was alleviated. We also found the strain of *C* Δ *vraSR* can recovery their pathogenicity. *VraSR* can increase the pathogenicity of *Staphylococcus aureus*.

Key words *Staphylococcus aureus*; *VraSR*; gene knockout; pathogenicity