文章编号:1000-5404(2009)15-1447-03

论著

临床分离金黄色葡萄球菌生物膜相关基因的PCR分析

孙凤军,枉 前,夏培元 (第三军医大学西南医院药剂科,重庆 400038)

摘 要:目的 确定临床分离的金黄色葡萄球菌生物膜形成能力和生物膜相关基因之间的关系,为生物膜形成的机制研究提供依据。**方法** 96孔板番红染色法检测生物膜的形成,*ica*AD、*ica*BC、*sar*、*agr* 和 *sig*B 的PCR扩增,并对产物进行测序和同源性比较。**结果** 27株金黄色葡萄球菌中共有17株形成了肉眼可见的生物膜,其中以X387和X409两株最明显;有22株扩增出 *ica*AD 和 *ica*BC,全部菌株扩增出 *sar*、*agr* 和 *sig*B。**结论** ica是形成金葡菌生物膜的关键基因,但 *ica* 在形成生物膜过程中需要其他基因的协同作用。

关键词: 金黄色葡萄球菌;生物膜;生物膜相关基因
中图法分类号: R378.11; R446.5 **文献标识码:** A

PCR analysis of clinically isolated *Staphylococcus aureus* biofilm associated gene

SUN Feng-jun, WANG Qian, XIA Pei-yuan (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation of biofilm forming ability with biofilm associated gene of the clinically isolated Staphylococcus aureus for providing basis for the further studies of the mechanisms of biofilm formation. **Methods** Safranine staining was conducted for the detection of the forming ability of biofilm in 96-well plates. icaAD, icaBC, sar, agr and sigB was amplified by PCR. **Results** Formation of biofilm could be found macroscopically in 17 out of 27 strains, especially to X387 and X409. icaAD and icaBC were amplified in 22 isolates and sar, agr and sigB in all 27 S. aureus strains. **Conclusion** ica operon is the key gene for biofilm formation but cooperative action of other genes is needed during the process of biofilm formation.

Key words: *staphylococcus aureus*; biofilm; biofilm associated gene

金黄色葡萄球菌(*staphylococcus aureus*)是医院感染的重要病原菌之一,也是生物膜感染常见的病原菌。在导管相关感染导致的败血症中,金黄色葡萄球菌是最常见的致病菌之一[1,2]。形成生物膜的金黄色葡萄球菌具有高度的耐药性并能逃避免疫系统的攻击,其感染易慢性化并难于控制,因此对金黄色葡萄球菌等临床重要病原菌的生物膜形成机制的研究已成为抗感染研究领域的热点。目前对金黄色葡萄球菌生物膜的形成机制仍不清楚。初步研究显示生物膜的形成首先是由细胞壁相关因子调节的细胞表面的附着,随后细菌在 *sar*、*agr* 和 *sig*B 等基因的调节下[3-5],主要通过 *ica* 操纵子表达产物共同催化合成的多糖胞间粘附素(polysaccharide intercellular adhesin, PIA)介导,细胞增殖并相互聚集成细胞团块,继而形成生物膜[6]。为了解这些可形成生物膜与未能形成生物膜的金黄色葡萄球菌中生物膜形成相关基因的存在情况,有研究对部分生物膜形成相关基因进行扩增,并进行了统计分析,但主要集中于单一基因的分析[2-5]。本实验针对生物膜形成相关基因 *ica*、*sar*、*agr* 和 *sig*B 设计特异性引物,进行多个基因的PCR分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 27株金黄色葡萄球菌(X236、X238、X239、X250、X274、X285、X318、X321、X360、X362、X364、X365、X382、X383、X385、X387、X391、X393、X409、X411、X418、X422、X425、X426、X428、X430和X431)均分离于第三军医大学西南医院2006年7月至2007年12月住院烧伤患者的临床送检标本,经美国产BBLCRYSTAL™ AUTOREADER快速细菌自动鉴定仪鉴定。细菌形成生物膜的能力检测采用96孔板番红染色法,27株金黄色葡萄球菌中共有17株形成了肉眼可见的生物膜(X318,X285,X250,X238,X393,X387,X385,X383,X382,X430,X428,X426,X425,X418,X411和X409),其中以X387和X409两株最明显[7]。

1.1.2 主要试剂 Promega基因组DNA抽提试剂盒和琼脂糖(Agarose Ultra Pure)购自Promega公司,*Taq*DNA聚合酶购自TAKALA公司,DNA标准均购自天为时代科技有限公司,dNT-

基金项目:国家自然科学基金(30572366)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30572366)
作者简介:孙凤军,男,黑龙江省大庆市人,药师,主要从事细菌耐药性方面的研究。电话:(023)68765991,E-mail: cm20030409@yahoo.com.cn
通信作者:夏培元,E-mail:py_xia@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-09-18;修回日期:2008-10-27

Pmix、溶菌酶和溶金黄色葡萄球菌酶购自上海申能博彩生物科技有限公司,引物由上海生工生物工程公司合成,测序由上海生工生物工程公司完成。EDTA (Disodium Salt, Dihydrate)为AMRESO产品分装,购自上海生工生物工程有限公司,Trytone购自上海生工生物工程有限公司(BBI分装),番红购自OMIGA公司。

1.1.3 主要仪器 PCR扩增仪、电泳仪和凝胶成像系统均为BIO-RAD公司产品,低温离心机(法国Jouan公司,MR23i型);恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂,SPX-150-Z型),超净工作台(苏净集团安泰空气技术有限公司,SW-CJ-2FD型);低温冰箱(日本SANYO公司),恒温震荡培养箱(上海跃进医疗器械厂, THZ-92B型),电子天平(Sartorius公司,BP221S型),旋涡震荡器(上海跃进医疗器械厂)。

1.2 实验方法

*ica*AD、*ica*BC、*sar*、*agr* 和 *sig*B序列的扩增 参照GenBank(CP000046)上的基因序列,采用Primer Premier5.0软件针对*ica*AD、*ica*BC、*sar*、*agr* 和 *sig*B序列设计引物,见表1。

表1 *ica*AD、*ica*BC、*sar*、*agr* 和 *sig*B基因引物序列

基因	引物序列	产物大小(bp)
*sig*B	正义:5′-CGGATCCGGTGTGACAATCAGFATGAC-3′	937
	反义:5′-CGGAATTCGCGACATTTATGTGGATACAC-3′	
agr	正义:5′- GTGCCATGGGAAATCACTCCTTCC -3′	976
	反义:5′-TGGTACCTCAACTTCATCCATTATG-3′	
sar	正义:5′-CGGTACCGTTGATTTGGGTAGTATGC-3′	867
	反义:5′-TTGCCATGGTTAAAACCTCCC-3′	
*ica*AD	正义:5′- CCTAACTAACGAAAGGTAGG -3′	1 266
	反义:5′- TTAGCGTTGGGTATTCCCTC -3′	
*ica*BC	正义:5′- ATGGTCAAGCCCAGACAGAG -3′	1 188
	反义:5′- GCACGTAAATATACGAGTTC -3′	

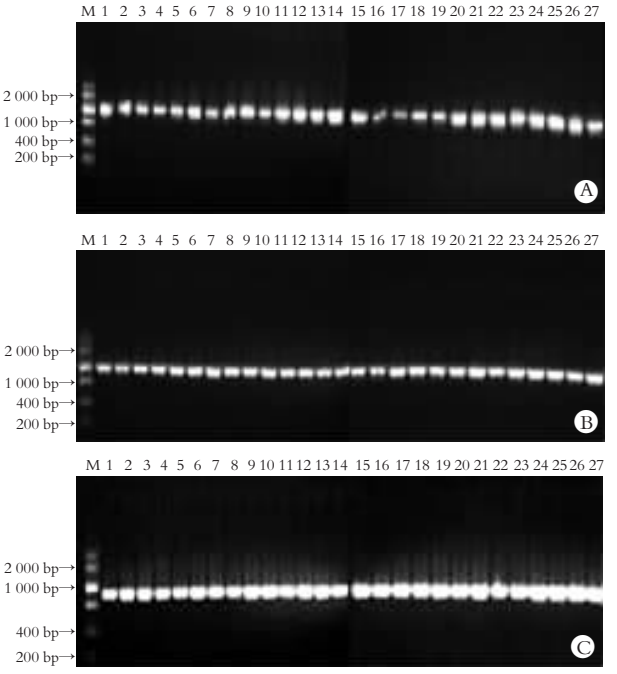
挑取单菌落于5 ml LB培养基中培养增菌20 h,取1 ml菌液14 000 × *g* 离心2 min,去上清后以480 μl EDTA悬浮,加50 μl 10 mg/ml溶菌酶和50 μl 10 mg/ml的溶葡萄球菌酶,混匀后37 ℃孵箱孵育40 min,14 000 × *g* 离心1 min,收集离心物。按照Promega公司基因组DNA抽提试剂盒说明书抽提染色体DNA,1%琼脂糖凝胶(EB浓度为0.5 μg/ml)电泳确证,分装置于-20 ℃的冰箱中备用。

以上述制备的细菌染色体为模板,PCR反应条件为:94 ℃,3 min预变性1次;94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,共30次循环;末次循环后于72 ℃延伸10 min;4 ℃保存。反应结束后,产物以1%琼脂糖凝胶(EB浓度为0.5 μg/ml)电泳,上样量5 μl,5 V/cm电压×30 min,凝胶成像系统成像观察结果,并选择菌株X387的PCR产物进行产物测序。反应体系终体积50 μl,组成:模板1 μl,引物浓度为(20 μmol/L)1 μl,10 × buffer 5 μl,mg^{2+} (1.5 mmol/L)3 μl,dNTP(2.5 mmol/L)4 μl,*Taq* 酶2.5 U 0.25 μl,双蒸水32.75 μl。将生物公司报告测得的PCR扩增产物核甘酸序列在GenBank上进行同源性比较。

2 结果

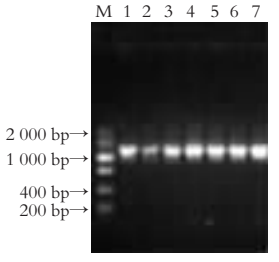
2.1 金黄色葡萄球菌生物膜形成相关基因PCR扩增

结果表明,实验所用的27株细菌均有 *sar*、*agr* 和 *sig*B基因,分别见图1。27株金黄色葡萄球菌有22株的染色体上存在 *ica* 操纵子,分别见图2、3。



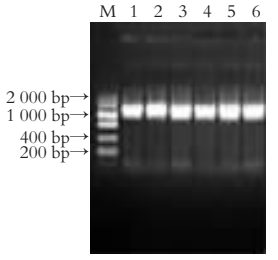
A: *sig*B; B: *agr*; C: *sar* M:标准;1~27:分别为金黄色葡萄球菌X236、X238、X239、X250、X274、X285、X318、X321、X360、X362、X364、X365、X382、X383、X385、X387、X391、X393、X409、X411、X418、X422、X425、X426、X428、X430和X431的基因PCR产物

图1 *sig*B、*agr* 和 *sar* PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图



M: 标准;1-7:分别为金黄色葡萄球菌X236、X238、X239、X250、X274、X285、X321的 *ica*AD基因PCR产物

图2 *ica*AD PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图



M: 标准;1-6:分别为金黄色葡萄球菌X236、X238、X239、X250、X274、X285、X321的 *ica*BC基因PCR产物

图3 icaBC PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

2.2 金黄色葡萄球菌X387的 *sig*B、*agr*、*ica*AD 和 *ica*BC基因PCR产物测序及同源性分析

为对 *ica*AD 、*ica*BC 、*sar*、*agr* 和 *sig*B扩增的正确性进行验证,对PCR产物片断进行同源性比较。X387*sig*B PCR扩增产物共测806个核苷酸,可比较序列与注册号为Y09929.1的金黄色葡萄球菌的 *sig*B基因序列99%同源。*agr* PCR扩增产物

测序可比较序列与注册号为 CP000046.1 的金黄色葡萄球菌的 *agr* 基因序列 100% 同源。X387*sar* 的可比较序列与注册号为 CP000046.1 的金黄色葡萄球菌的 *sar* 基因序列 100% 同源。*ica*AD PCR 扩增产物可比较序列与注册号为 CP000046.1 的金黄色葡萄球菌的 *ica*AD 基因序列 98% 同源。*ica*BC PCR 扩增产物可比较序列与注册号为 CP000046.1 的金黄色葡萄球菌的 *ica*BC 基因序列 97% 同源。

3　讨论

实验结果显示,金黄色葡萄球菌 X387 的 *ica*AD、*ica*BC、*sar*、*agr* 和 *sig*B 的同源性分析发现与 GenBank 报告的金黄色葡萄球菌相应基因的同源性均≥97%。因此我们认为这些基因多为维持细菌生命所必须的保守基因。本实验中生物膜观察采用操作简单、便于观察的 96 孔板番红染色法,在生物膜形成中我们曾采用了电镜观察法,但是由于电镜观察需要脱水,导致生物膜断裂,观察不连续,且电镜观察较局限,不利于生物膜形成能力的比较观察。

ica 操纵子定位于细菌染色体,包括位于 *ica*A 上游的阻遏基因 *ica*R 及串联存在的 *ica*A、*ica*D、*ica*B 和 *ica*C 基因,全长 3.4 kb。*ica*ADBC 分别编码 IcaA、D、B、C 4 种不同蛋白质,其中 *ica*A 产物 IcaA 蛋白是一种跨膜蛋白,含 412 个氨基酸残基,有 N-乙酰葡萄糖氨基转移酶活性。*ica*C 编码的 IcaC 蛋白是一种插入细胞膜的疏水性蛋白,含 355 个氨基酸残基。而 *ica*B 编码的 IcaB 可能是一种分泌性蛋白[6,8]。*ica* 操纵子编码的产物共同催化合成具有 130 个以上 β-1 ,6 连接结构的脂多糖,即在葡萄球菌生物膜形成过程中细菌粘附的关键物质 PIA。此前的报道认为,*ica* 在金黄色葡萄球菌普遍存在[9],直接与细菌生物膜的形成有关,是生物膜形成的必要因素[6,8,9]。本实验 PCR 分析结果显示,27 株金黄色葡萄球菌中的 22 株具有 *ica* 操纵子,未发现只含有 *ica*AD 或者 *ica*BC 的菌株。具有 *ica* 操纵子的 22 株中包括全部 17 株可以形成生物膜的细菌,表明不含有 *ica* 的菌株不能形成生物膜,但有 *ica* 并不一定能形成生物膜,该结果与不依赖 *ica* 的金黄色葡萄球菌形成生物膜的研究结果不一致[6,10,11],提示部分金黄色葡萄球菌中存在与 *ica* 功能相类似的基因或可能存在其他的因素调节 *ica* 的表达,可以产生与 *ica* 表达类似的效果,但目前国内外少见相关报道,值得进一步研究。

*sig*B、*sar* 和 *agr* 基因在金黄色葡萄球菌生命过程中执行重要功能,其中 *sar* 是金黄色葡萄球菌的附属调节因子,可广泛调节细胞内、细胞外蛋白的表达[4];*agr* 是金黄色葡萄球菌附属基因调节因子,主要调节毒素及表面蛋白的表达[5],*sig*B 主要调节细菌在应激条件下基因的转录、表达[3,4]。人工构建 *sar*、*agr* 突变的菌株中,细菌的粘附力下降,致病力减弱;而 *sig*B 突变的菌株对酸碱、厌氧的耐受减弱。关于 *sar*、*agr* 和 *sig*B 在金黄色葡萄球菌中的分布情况,目前国内外少见相关报道。本研究结果显示实验所用的 27 株细菌均含有 *sig*B、*sar* 和 *agr* 基因,提示 *sig*B、*sar* 和 *agr* 基因可能为金黄色葡萄球菌生存所必须,在金黄色葡萄球菌中普遍存在。由于本研究中仅有 17 株细菌在正常培养条件下形成了生物膜,表明它们虽然可以单独直接调节生物膜的形成,但可能在其过程中还需要另外一些未知因素的参与,才能最终调控生物膜的形成,因此通过敲除这些基因进行研究可以为了解和确定这些未知因素及其意义和明确生物膜形成的机制奠定基础。

参考文献:

[1] Smith K, Perez A, Ramage G, *et al*. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of Staphylococcus aureus[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(Pt 8):1018 - 1023.

[2] Kwon A S, Park G C, Ryu S Y, *et al*. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of Staphylococcus aureus[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(1): 68 - 72.

[3] Rachid S, Ohlsen K, Wallner U, *et al*. Alternative transcription factor sigma(B) is involved in regulation of biofilm expression in a Staphylococcus aureus mucosal isolate[J]. J Bacteriol, 2000, 182(23): 6824 - 6826.

[4] Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, *et al*. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by Staphylococcus aureus[J]. Mol Microbiol, 2003, 48(4): 1075 - 1087.

[5] Boles B R, Horswill A R. Agr-mediated dispersal of Staphylococcus aureus biofilms[J]. PLoS Pathog, 2008, 4(4): e1000052.

[6] Frank K L, Patel R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive Staphylococcus lugdunensis isolates[J]. Infect Immun, 2007, 75(10):4728 - 4742.

[7] 孙凤军,枉　前,夏培元. 临床分离金黄色葡萄球菌药物敏感性和形成生物膜的相关性分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2008,9(2): 123 - 125.

[8] Rupp M E, Fey P D, Heilmann C, *et al*. Characterization of the importance of Staphylococcus epidermidis autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model[J]. J Infect Dis,2001,183(7): 1038 - 1042.

[9] Fowler V G Jr., Fey P D, Reller L B, *et al*. The intercellular adhesin locus ica is present in clinical isolates of Staphylococcus aureus from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints[J]. Med Microbiol Immunol, 2001, 189(3): 127 - 131.

[10] Fitzpatrick F, Humphreys H, OGara J P. Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4): 1973 - 1976.

[11] Blevins J S, Elasri M O, Allmendinger S D, *et al*. Role of sarA in the pathogenesis of Staphylococcus aureus musculoskeletal infection [J]. Infect Immun, 2003, 71(1): 516 - 523.

（编辑　龙　亮）