DOI:10.16016/j.1000-5404.201908007

金黄色葡萄球菌 RNAⅢ敲除株对 γ-溶血素表达调控的影响

谭 利[1],王轶男[1],陈 江[1],姜 北[2],喻胜鹏[3],黎 庶[1],胡晓梅[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):基础医学院微生物学教研室[1];第一附属医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2];第一附属医院骨科,全军矫形外科中心[3]

[**摘要**] **目的** 利用同源重组技术构建金黄色葡萄球菌 Newman RNAⅢ基因敲除株,探究 RNAⅢ敲除对金葡菌 γ-溶血素表达调控的影响。**方法** 分别扩增 RNAⅢ基因的上下游同源臂,根据同源重组原理,构建 pBT2 基因敲除载体,利用同源重组技术,构建 RNAⅢ敲除株。并对野生株和敲除株 γ-溶血素的转录水平和蛋白水平进行研究。**结果** 实时荧光定量 PCR 结果显示 RNAⅢ敲除株 γ-溶血素 A/B/C 亚基的转录水平较野生株显著降低,Western blot 检测结果也显示敲除株 γ-溶血素蛋白表达水平较野生株明显减少。**结论** RNAⅢ敲除可显著影响金葡菌 γ-溶血素的表达。

[**关键词**] 金黄色葡萄球菌;RNAⅢ;γ-溶血素;基因敲除
[**中图法分类号**] R378.11;R394-33;R394.2 [**文献标志码**] A

Effect of deletion of *Staphylococcus aureus* RNAⅢ on γ-hemolysin expression

TAN Li[1], WANG Yinan[1], CHEN Jiang[1], JIANG Bei[2], YU Shengpeng[3], LI Shu[1], HU Xiaomei[1] [1]Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, [3]Department of Orthopedics, Center of Plastic Surgery, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a RNAⅢ gene knockout mutant of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and evaluate the effect of RNAⅢ on the expression of γ-hemolysin. **Methods** In order to construct temperature-sensitive *S. aureus* knock-out vectors, 2 homologous sequences around RNAⅢ were cloned and inserted into pBT2 vector to construct knock-out plasmid pBT2::RNAⅢ, and then the obtained plasmids RNAⅢ were transferred into *S. aureus* strain Newman, finally Newman::ΔRNAⅢ mutant were prepared with homologous recombination. The transcriptional level of γ-hemolysin hlgA/B/C was detected by quantitative real-time PCR (RT-PCR) and the protein levels in the culture supernatants of Newman wild type strain and Newman::ΔRNAⅢ were analyzed with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis. **Results** Newman::ΔRNAⅢ mutant was constructed successfully. RT-PCR analysis revealed that the expression of γ-hemolysin in the Newman::ΔRNAⅢ mutant was significantly decreased as compared to that of Newman wild type strain. Western blotting also showed the transcription level of γ-hemolysin was significantly reduced in the mutant strain. **Conclusion** The knockout of RNAⅢ has a great effect on the expression of γ-hemolysin in *S. aureus*.

[**Key words**] *Staphylococcus aureus*; RNAⅢ; γ-hemolysin; homologous recombination

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31570127, 31470241). Corresponding author: HU Xiaomei, E-mail: hxmay2008@163.com

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,简称金葡菌)是一种既可引起医院流行感染又可导致社区散发感染的重要病原菌[1]。金葡菌可产生大量的穿孔毒素(pore-forming toxins, PFTs)溶解细胞。γ-溶血素(γ-hemolysin)是葡萄球菌产生的一种双组分穿孔毒素,类似杀白细胞素,主要作用于人类和其他哺乳动物的血

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(31570127, 31470241)
[**通信作者**] 胡晓梅,E-mail:hxmay2008@163.com

细胞等,从而在金葡菌的致病、免疫逃逸等方面发挥重要作用[2-3]。

附属调节系统(accessory gene regulator ,Agr)是金葡菌中非常重要的双组分调节系统,控制着多种毒力因子的表达。RNAⅢ是金葡菌 Agr 群体感应调控系统的组成成分,也是 Agr 系统关键的效应分子[4]。在主要的毒力因子中,α-溶血素、杀白细胞素、肠毒素、脂酶都受到 RNAⅢ的直接调控,而 γ-溶血素是否受到 RNAⅢ的调控尚不明确。

为研究 RNAⅢ的敲除是否会影响 γ-溶血素的表达,我们利用同源重组技术构建了 Newman RNAⅢ敲除株,RT-PCR 表明 RNAⅢ敲除株的 γ-溶血素 A 亚基和 BC 亚基转录均降低,进一步对 Newman 野生株及 RNAⅢ敲除株培养上清的蛋白进行 Western blot 比较分析,发现 RNAⅢ的敲除可导致 γ-溶血素蛋白表达水平显著降低,提示 RNAⅢ可调控 γ-溶血素蛋白的表达,也为进一步研究 RNAⅢ调控 γ-溶血素的表达具体机制提供了研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

金葡菌 RN4220 为限制性内切酶缺陷菌株,可接受并修饰来自大肠埃希菌的穿梭质粒,由中国科学技术大学孙宝林教授惠赠。质粒 pBT2 为温度敏感型穿梭质粒,具有氨苄和氯霉素抗性。金葡菌 Newman 购自中国菌种保藏中心。

1.2 主要试剂和实验仪器

氯霉素(chloramphenicol,Chl)和氨苄(ampicillin,Amp)、溶葡萄球菌素购自上海生工生物工程技术服务有限公司;PrimeSTAR 高保真聚合酶、限制性内切酶、DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 Promega 公司;胰蛋白胨大豆肉汤培养基(tryptone soya broth,TSB)、胰蛋白胨、酵母提取物等购自英国 Oxiod 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 引物设计 根据 GenBank 中金葡菌 Newman 基因组序列利用 Primer Premier 5.0 软件设计 RNAⅢ基因上下游片段引物(引物 RNAⅢ-上游-正向和 RNAⅢ-上游-反向用于扩增 RNAⅢ上游片段,片段长度 852 bp; RNAⅢ-下游-正向和 RNAⅢ-下游-反向用于扩增下游片段,片段长度 1 002 bp)。为克隆需要,分别在引物序列中引入不同的酶切位点。并依据 RNAⅢ-基因上下游片段的外侧序列设计引物 RNAⅢ-外侧-正向和 RNAⅢ-外侧-反向,用于 RNAⅢ敲除株的鉴定。根据 Newman 基因组中 γ-溶血素基因 ABC 亚基序列设计实时荧光定量 PCR 引物,所设计的引物均交由重庆百诺合一生物科技有限公司合成。各引物具体序列详见表 1。

1.3.2 RNAⅢ/Newman 敲除株的构建 分别扩增 RNAⅢ左臂同源片段及右臂同源片段,经限制性内切酶酶切后克隆插入质粒 pBT2,构建基因敲除载体(pBT2::RNAⅢ)。然后电穿孔转化限制系统缺陷型金葡菌 RN4220,涂布于氯霉素平板进行筛选。将经过 RN4220 修饰后的阳性菌株质粒,电转化 Newman 感受态,置于 30 ℃孵箱培养。过夜培养经酶切鉴定的阳性 Newman 菌株,次日以 1∶100 比例接种于 TSB 氯霉素抗性培养基中,42 ℃过夜培养,过夜菌划平板于 42 ℃孵箱培养。挑单菌落过夜纯培养后提取基因组,PCR 扩增筛选含有整合质粒的单交换菌株,于 25 ℃无抗 TSB 液体培养基连续诱导培养 3 轮,划平板于 37 ℃孵箱培养。挑单菌落分别接种无抗 TSB 和氯霉素抗性 TSB

表 1 PCR 引物及序列

引物名称	序列	用途
RNAⅢ-上游-正向	5′-CGGAAGCTTAGTCGATATCGTAGCTGG-3′	扩增 RNAⅢ上游序列
RNAⅢ-上游-反向	5′-AAACGTCGACTATGGTCGTGAGCC-3′	
RNAⅢ-下游-正向	5′-ACGCGTCGACCAACTATTTTCCATC-3′	扩增 RNAⅢ下游序列
RNAⅢ-下游-反向	5′-CGCGAATTCATTCCACCTACTATCACAC-3′	
RNAⅢ-外侧-正向	5′-GTTTTTCATTTATTAAACATTTAGCTGAAAAATATAA-3′	鉴定 RNAⅢ是否敲除成功
RNAⅢ-外侧-反向	5′-TGGTATTGTAAACATTAATATCATTTGAGTTAATAC-3′	
γA-正向	5′-GCTTTCACTCCCCATTTAACACC-3′	检测 Hemolysin γA 转录水平
γA-反向	5′-CCATCAATCGGAGGCAGTGG-3′	
γB-正向	5′-TTGCGCTATGAAGTTTTGGC-3′	检测 Hemolysin γBC 转录水平
γB-反向	5′-CGAGATAGCTTCCACCCAACAT-3′	
16S-正向	5′-CGACAACCATGCACCACCTG-3′	扩增内参基因 16s rRNA
16S-反向	5′-TGACGTCATCCCCACCTTCC-3′	

平板,37 ℃培养,挑取在无抗培养基上生长而在氯霉素抗性 TSB 平板上不生长的菌落于无抗 TSB 中培养后提取基因组,PCR 及测序筛选鉴定双交换敲除株。

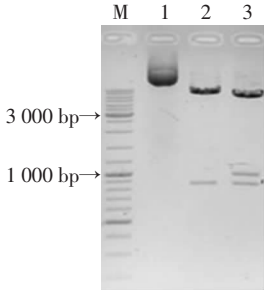
1.3.3 实时荧光定量 PCR 分别挑取 Newman 野生株、△RNAⅢ/Newman 敲除株单菌落,接种于 2 mL TSB 液体培养基中,37 ℃振荡培养过夜。次日将过夜菌按 1∶100 比例转种 2 mL 新鲜 TSB 液体培养基,37 ℃振摇培养至对数生长期抽提细菌总 RNA:将菌液离心集菌后,重悬于 100 μL TE 缓冲液(含 3 mg/mL 溶菌酶和 10 μL 1 mg/mL 溶葡萄球菌素),37 ℃作用 0.5 h 破坏细菌细胞壁,而后用 1 mL Tripure 试剂(Roche 公司)进行细菌总 RNA 抽提(参照试剂说明书进行),并以 Dnase Ⅰ(Promega 公司)处理去除 RNA 中细菌基因组污染。而后取细菌总 RNA 取 500 ng,用 primescript RT Reagent Kit(TaKaRa 公司)分别进行 cDNA 逆转录(参照试剂盒说明书进行)。cDNA 样本经 100 倍稀释后取 2 μL 作为模板,用 SYBR Premix *Ex Taq*™ Ⅱ (Tli RNaseH plus)试剂(TaKaRa 公司)对 Newman 野生株及△RNAⅢ/Newman 敲除株 γ-溶血素 A 亚基、B 亚基以及 C 亚基基因转录水平进行定量 RT-PCR 分析比对(所用引物详见表 1)。RT-PCR 反应条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,40 cycles。

1.3.4 野生株和敲除株上清蛋白 SDS-PAGE 分析及 Wernter blot 检测 分别挑取 Newman 野生株、△RNAⅢ/Newman 敲除株单菌落,接种于 2 mL TSB 液体培养基中,37 ℃振荡培养过夜。次日将过夜菌按 1∶100 比例转种 2 mL 新鲜 TSB 液体培养基,37 ℃振摇培养 16 h,取 1 mL 菌液用 TCA-丙酮蛋白浓缩法浓缩沉淀上清蛋白。蛋白样品加入上样 buffer,5 min 煮沸处理后,进行 SDS-PAGE 分析。取出电泳后的 SDS-PAGE 凝胶,放入转膜缓冲液中,平衡 10 min。剪取适宜大小的 PVDF 膜,放入甲醇中浸泡 1 min 中后,与滤纸一起,放入转膜缓冲液中平衡 10 min。将电泳槽中夹板取出打开,将海绵层,滤纸,凝胶,PVDF 膜,滤纸,海绵,依次按顺序叠加好,将夹板对应好正负极放入电泳槽中,加入转膜缓冲液,15 V 转膜 30 min。转膜结束后,切断电源,取出 PVDF 膜。将 PVDF 膜放入封闭液中过夜封闭,而后将 PVDF 膜放入 PBST 缓冲液中,置于水平振荡器震荡洗涤 5 min。按 1∶2 500 比例稀释一抗(用 PBST 稀释),室温下震荡孵育 1 h,然后用 PBST 震荡洗 PVDF 膜 5 次,每次 5 min。按 1∶2 500 比例稀释二抗(PBST 稀释),室温孵育 30 min,然后用 PBST 震荡洗 PVDF 膜 5 次,每次 5 min。最后将显影剂与曝光液按 1∶1混合,均匀铺于 PVDF 膜表面,放入曝光仪曝光。

2 结果

2.1 RNAⅢ同源左右臂扩增及重组质粒构建

以金葡菌 Newman 为模板,分别扩增 RNAⅢ基因同源左右臂,得到片段大小为 852 bp 的上游片段,1 002 bp 的下游片段。分别将上下游片段先后经酶切位点克隆至 pBT2 中,构建敲除质粒 pBT2∷ΔRNAⅢ(图 1),转化大肠杆菌经双酶切和三酶切验证正确(图 1),证实目的片段插入成功,重组质粒命名为 pBT2∷ΔRNAⅢ。

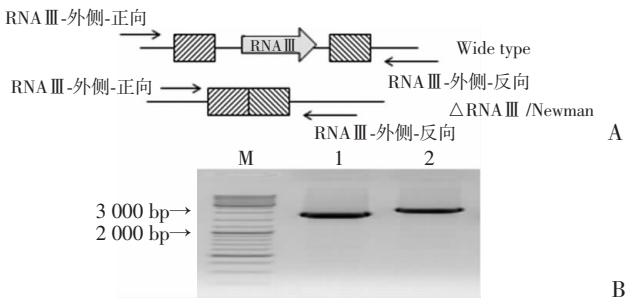


M:DNA 分子量标准;1:重组质粒;2:重组质粒双酶切验证;3:重组质粒三酶切验证

图 1 pBT2∷ΔRNAⅢ重组质粒构建

2.2 △RNAⅢ/Newman 敲除株的筛选与鉴定

将鉴定正确的 pBT2∷ΔRNAⅢ质粒先后电转 RN4220 及 Newman 感受态。利用质粒温度敏感性特征进行敲除株的筛选,并对获得的阳性重组菌株进行 PCR 鉴定。结果显示:敲除株采用 RNAⅢ-外侧-正向以及 RNAⅢ-外侧-反向引物对扩增所得 PCR 产物约 2 000 bp(图 2 泳道 1),较 Newman 野生株相应扩增产物(约 2 500 bp,见图 2 泳道 2)短 500 bp(RNAⅢ长度),提示 RNAⅢ基因已从 Newman 基因组中成功敲除。将敲除株 RNAⅢ-外侧-正向以及 RNAⅢ-外侧-反向引物对 PCR 扩增产物送测序,测序结果证实 RNAⅢ被敲掉,△RNAⅢ/Newman 敲除株构建成功。

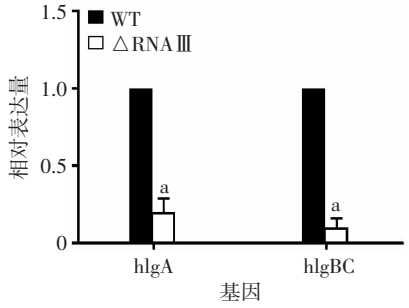


A:PCR 鉴定△RNAⅢ/Newman 敲除株示意图;B:PCR 电泳鉴定敲除株;M: DNA 分子量标准; 1:△RNAⅢ/Newman 敲除株;2:Newman 野生株

图 2 △RNAⅢ/Newman 敲除株的 PCR 鉴定

2.3 △RNAⅢ/Newman 敲除株 γ-溶血素转录水平分析

培养 Newman 野生株及 RNAⅢ敲除株,于对数生长期收集菌液,离心集菌后提取细菌总 RNA,逆转录生成 cDNA,采用实时荧光定量 PCR 技术对 γ-溶血素亚基 hlgA、hlgBC 基因的转录水平进行分析。结果表明 RNAⅢ敲除后,hlgA、hlgBC(hlg2)的表达均显著下调($P<0.01$,图 3),证明 RNAⅢ可以正调控 γ-溶血素的转录。

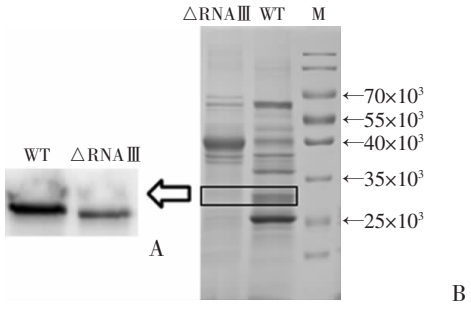


a:$P<0.01$,与 WT 比较

图 3 Newman 野生株及 RNAⅢ敲除株 γ-溶血素基因转录水平分析

2.4 △RNAⅢ/Newman 敲除株培养上清蛋白分析

过夜培养 Newman 野生株及 RNAⅢ敲除株,次日按 1∶100 转种新鲜培养基,16 h 后回收菌液,离心收集培养上清,TCA 法沉淀上清蛋白,而后经 12% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色。结果显示:与 Newman 野生株相比,RNAⅢ的敲除可导致多种蛋白表达量明显降低,也可导致部分蛋白表达量上升(图 4)。为进一步明确 RNAⅢ对 γ-溶血素的表达调控作用,将 γ-溶血素免疫兔子制备 hlgC 多克隆抗体。Werstern blot 检测 RNAⅢ敲除株 γ-溶血素的表达水平。Werstern blot 结果显示,相对于野生株,RNAⅢ敲除株 γ-溶血素蛋白表达水平(32×10^3 处条带)明显下调(图 4),和转录水平的结果一致。



M:蛋白分子量标准;WT:Newman 野生株;△RNAⅢ:△RNAⅢ/Newman 敲除株;A:Werstern blot 检测结果;B:1 mL 上清蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

图 4 Newman 野生株及 RNAⅢ敲除株蛋白表达分析

3 讨论

金葡菌可以分泌多种 β 桶状结构的毒素,包括 α-溶血素(α-HL),γ-溶血素(γ-HL),杀白细胞素(LUK)以及 PVL 来裂解细胞。其中,γ-溶血素基因座(hlg)含有 3 个开放阅读框,包含 3 个基因(hlgA、hlgC、hlgB)。hlgA 由 1 个开放读码框组成;hlgC、hlgB 为共转录基因(hlg2),因此 γ-溶血素由两种组合方式(A+B,C+B)[5],其中 hlgB(F 组分)绑定目标细胞的磷脂酰胆碱,S 组分绑定到宿主细胞膜,导致细胞裂解[6-7]。当 γ-溶血素的每种水溶性组分低聚合成后,由 4 种 F 组分和 4 种 S 组分交替排列形成预孔结合至细胞表面,成熟的异源八聚体形成跨膜 β-桶孔后穿过质膜导致宿主细胞裂解[8]。临床分离的菌株 99% 会产生 γ-溶血素[9]。γ-溶血素主要是通过破坏红细胞,有助于发挥免疫逃逸功能。有研究表明老鼠感染野生型金黄色葡萄球菌后,相对于 hlg 敲除株,小鼠炎症巨噬细胞 CCR2 的比例明显下降。在人血液中培养 USA300,发现 hlgA、hlgB、hlgC 基因的转录水平显著升高。进一步敲除 hlg 后小鼠菌血症模型的存活率升高[10-11]。

以往的研究表明 Sae 二元调控系统参与了 γ-溶血素的表达调控[12]。本实验结果也提示 Agr 系统的效应分子 RNAⅢ可以调控 γ-溶血素的表达。Agr 系统是金葡菌中重要的二元调控系统,控制 100 多种毒力基因的表达。包括两个相反的转录单元 RNAⅡ和 RNAⅢ,分别由 P2 和 P3 启动子转录。其中 Agr 直接和 PSM 的启动子结合,激活 PSM 毒素基因的合成[13]。RNAⅢ是 Agr 的关键效应分子。在转录和翻译水平调控许多毒素、酶以及表面蛋白的表达。在金葡菌高表达的毒力因子中,α-溶素、杀白细胞素、肠毒素、脂酶都受到 RNAⅢ的直接调控,而 γ-溶素是否受到 RNAⅢ的调控尚不明确。

我们采用基因重组的方法对金葡菌 Newman 的 RNAⅢ基因进行敲除,并检测了其对金葡菌 γ 溶血素表达调控的影响。结果显示,RNAⅢ对金葡菌 γ-溶血素的表达具有正调控作用。虽然 RNAⅢ对 γ-溶血素调控的具体机制不清楚,但 RNAⅢ作为效应分子,可通过直接的碱基配对方式正调控或负调控多种毒力因子的表达。如 RNAⅢ可通过 3′-端茎环结构与多个靶 mRNAs 核糖体结合位点的结合从而阻止翻译的开始。通过这种机制,RNAⅢ抑制主要表面蛋白的合成,例如蛋白 A、凝固酶、SBI 和纤维蛋白原结合蛋白(SA1000)[14-15];亦可通过其 5′-端茎环结构与靶基因

mRNA 的结合促进其表达,如 RNAⅢ 5′-端茎环结构与 α-溶血素 mRNA 的结合促进 α-溶血素表达[14]。除此之外,RNAⅢ也可通过同样的机制,抑制 Rot/mgrA 基因的翻译、编码,间接激活许多外毒素的转录[16]。γ-溶血素也属于 β 桶状结构的毒素,因此,我们推测 RNAⅢ对 γ-溶血素基因的表达调控极有可能是通过与 hlgA、hlgBC 亚基的一个或多个 mRNA 配对结合的方式激活 γ-溶血素的转录来发挥作用的。当然,这样的推测还尚需要后续的实验研究予以验证。

深入研究 RNAⅢ对 γ-溶血素地具体调控机制既能够促进人们对 γ-溶血素在金葡菌致病中重要作用的认识,又有可能阐明一种新的受 RNAⅢ调控的金葡菌的毒力因子,有望为临床致病性金葡菌感染的防治提供新的思路及候选靶标。本研究通过成功构建金葡菌 Newman RNAⅢ敲除株,观察到敲除株产生的上清蛋白数量及表达量显著降低,转录水平及翻译水平观察到 RNAⅢ敲除株中 γ-溶血素显著降低。本研究构建的敲除株与初步验证的结论为进一步深入研究 RNAⅢ调控 γ-溶血素的具体分子机制奠定了基础。

参考文献:

[1] KONG E F, JOHNSON J K, JABRA-RIZK M A. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an enemy amidst us[J]. PLoS Pathog, 2016, 12(10): e1005837. DOI:10.1371/journal.ppat.1005837.

[2] YAMASHITA K, KAWAI, TANAKA Y, *et al*. Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ-hemolysin reveals the β-barrel pore formation mechanism by two components[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(42): 17314-17319. DOI:10.1073/pnas.1110402108.

[3] ZIMMERMANN-MEISSE G, PRÉVOST G, JOVER E. Above and beyond C5a receptor targeting by staphylococcal leucotoxins: retrograde transport of panton-valentine leucocidin and γ-hemolysin[J]. Toxins (Basel), 2017, 9(1): E41. DOI:10.3390/toxins9010041.

[4] BRONESKY D, WU Z F, MARZI S, *et al*. *Staphylococcus aureus* RNAⅢ and its regulon link quorum sensing, stress responses, metabolic adaptation, and regulation of virulence gene expression[J]. Annu Rev Microbiol, 2016, 70: 299-316. DOI:10.1146/annurev-micro-102215-095708.

[5] OLIVEIRA D, BORGES A, SIMÕES M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases[J]. Toxins (Basel), 2018, 10(6): E252. DOI:10.3390/toxins10060252.

[6] TOMITA N, ABE K, KAMIO Y, *et al*. Cluster-forming property correlated with hemolytic activity by staphylococcal γ-hemolysin transmembrane pores[J]. FEBS Lett, 2011, 585(21): 3452-3456. DOI:10.1016/j.febslet.2011.09.041.

[7] DUMONT A L, YOONG P, DAY C J, *et al*. *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(26): 10794-10799. DOI:10.1073/pnas.1305121110.

[8] SPAAN A N, HENRY T, VAN ROOIJEN W J M, *et al*. The staphylococcal toxin panton-valentine leukocidin targets human C5a receptors[J]. Cell Host Microbe, 2013, 13(5): 584-594. DOI:10.1016/j.chom.2013.04.006.

[9] PREVOST G, COUPPIE P, PREVOST P, *et al*. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins[J]. J Med Microbiol, 1995, 42(4): 237-245. DOI:10.1099/00222615-42-4-237.

[10] SPAAN A N, VRIELING M, WALLET P, *et al*. The staphylococcal toxins γ-haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors[J]. Nat Commun, 2014, 5: 5438. DOI: 10.1038/ncomms6438.

[11] MALACHOWA N, WHITNEY A R, KOBAYASHI S D, *et al*. Global changes in *Staphylococcus aureus* gene expression in human blood[J]. PLoS ONE, 2011, 6(4): e18617. DOI:10.1371/journal.pone.0018617.

[12] YAMAZAKI K, KATO F, KAMIO Y, *et al*. Expression of gamma-hemolysin regulated by sae in *Staphylococcus aureus* strain Smith 5R[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 259(2): 174-180. DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00236.x.

[13] XU T, WANG X Y, CUI P, *et al*. The agr quorum sensing system represses persister formation through regulation of phenol soluble modulins in *Staphylococcus aureus*[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2189. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02189.

[14] VANDERPOOL C K, BALASUBRAMANIAN D, LLOYD C R. Dual-function RNA regulators in Bacteria[J]. Biochimie, 2011, 93(11): 1943-1949. DOI:10.1016/j.biochi.2011.07.016.

[15] LIU Y, MU C H, YING X M, *et al*. RNAⅢ activates map expression by forming an RNA-RNA complex in *Staphylococcus aureus*[J]. FEBS Lett, 2011, 585(6): 899-905. DOI:10.1016/j.febslet.2011.02.021.

[16] GUPTA R K, LUONG T T, LEE C Y. RNAⅢ of the *Staphylococcus aureus* agr system activates global regulator MgrA by stabilizing mRNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(45): 14036-14041. DOI:10.1073/pnas.1509251112.

(收稿:2019-08-01;修回:2019-08-23)

(编辑 邓强庭)