DOI:10.16016/j.2097-0927.202212145

基于 Antares2 的金黄色葡萄球菌生物发光示踪系统的构建

胡 珍,尚伟龙,饶贤才 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

[摘要] **目的** 构建融合型荧光素酶标记的金黄色葡萄球菌示踪菌株,建立金葡菌示踪系统。**方法** 采用同源重组技术将融合型荧光素酶 Antares2 编码基因敲入到金葡菌 USA300 基因组中,与金葡菌烯醇酶编码基因 *eno* 融合,构建稳定表达的示踪菌株。将示踪菌株与不同的底物混合,检测生物发光强度差异,筛选合适的菌株/底物示踪系统,并探究其在体外和体内的敏感性。**结果** 通过构建基因敲入质粒 pBT2-*eno-antares*2,转化金葡菌 USA300 菌株中进行基因敲入菌株筛选,经 DNA 测序和 Western blot 鉴定示踪菌株 USA300/Eno-Antares2 构建成功。细菌生长曲线和溶血实验表明所构建的示踪菌株与野生型 USA300 无明显差异。将示踪菌与 DTZ、FUR 和 HFZ 底物混合,肉眼均可观察到发光。不同浓度不同底物分析显示,USA300/Eno-Antares2/HFZ 组成的系统发光性能最优,体外发光示踪的敏感性为 50 CFU(菌落形成单位),小鼠体内示踪敏感性为 100 CFU。**结论** 金葡菌 USA300/Eno-Antares2/HFZ 示踪系统性能佳,可用于金葡菌感染、定植、播散等研究。

[关键词] 金黄色葡萄球菌;生物发光;示踪系统;荧光素酶
[中图法分类号] R378.11; R394-33; R446.5 [文献标志码] A

Construction of *Staphylococcus aureus* bioluminescence tracing system based on Antares2

HU Zhen, SHANG Weilong, RAO Xiancai Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a new fusion luciferase-labeled *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) tracing system. **Methods** An *S. aureus* tracer strain was constructed by using DNA homologous recombination technique. The gene encoding fusion luciferase Antares2 was knocked in the genome of *S. aureus* strain USA300 by fusing with the enolase (Eno) encoding gene. The bioluminescence intensity was analyzed by mixing with the tracer strain and different substrates. The suitable tracer/substrate system was selected based on the detection of bioluminescence intensity. The sensitivity of the tracer/substrate system *in vitro* and *in vivo* was also evaluated. **Results** The knock-in plasmid pBT2-*eno-antares*2 was constructed. After transformed into *S. aureus* USA300, the Antares2 knock-in strain was screened out. The tracer strain USA300/Eno-Antares2 was identified by DNA sequencing as well as Western blot detection of Eno-Antares2 fusion proteins. Bacterial growth curve and hemolytic activity tests showed comparable results between USA300/Eno-Antares2 tracer strain and its wild-type USA300. USA300/Eno-Antares2 catalyzed substrates diphenylterazine (DTZ), furimazine (FUR), and hydrofurimazine (HFZ) to produce macroscopical bioluminescence. Analysis of different substrates at diverse concentrations revealed that USA300/Eno-Antares2/HFZ system exhibited the best performance. This system enabled reliable bioluminescence tracking of *S. aureus* with sensitivities of approximately 50 colony forming unit (CFU) *in vitro* and 100 CFU *in vivo*. **Conclusion** *S. aureus* USA300/Eno-Antares2/HFZ tracing system is a good tool,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82272341)
[通信作者] 饶贤才,E-mail:raoxiancai@126.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

which can be used for the study of *S. aureus* infection, colonization, and dissemination.

[**Key words**] *Staphylococcus aureus*; bioluminescence; tracing system; luciferases

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82272341). Corresponding author: RAO Xiancai, E-mail: raoxiancai@126.com

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,简称金葡菌)是重要的人兽共患病原菌,可引起人创伤感染、肺炎、脑脓肿、脓毒症,牛、羊乳腺炎等感染性疾病[1-2]。2017-2021 年,据中国细菌耐药监测网(http://www.chinets.com)报道,我国临床金葡菌分离率均位列所有细菌分离率第 3 位,革兰阳性菌分离率第 1 位。金葡菌可产生上百种毒力因子参与致病,致病机制复杂[3]。在进行金葡菌致病机理研究及治疗策略探索的实践中,亟需一种高效、可靠的细菌示踪系统。

光学示踪成像主要采用荧光(fluorescence)和生物发光(bioluminescence)两种技术[4]。自绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein,简称 GFP)发现以来,该分子被广泛用于构建荧光报告系统,应用于肿瘤生长与转移、干细胞归巢等示踪研究中[5]。GFP 在接受其他分子提供的能量后可产生 509 nm 的绿色荧光,容易被机体组织细胞所吸收(波长<600 nm 的光都易被组织吸收)[6]。金葡菌等细菌的个体微小(约 1.0 μm),利用质粒表达 GFP 进行细菌示踪,尤其是体内示踪,效果不理想。一方面,质粒不稳定,在体内极易丢失;另一方面,GFP 体内荧光成像敏感性差,常常需要将实验动物处死,解剖取出脏器进行成像[7]。生物发光则是利用荧光素酶催化底物进行发光和示踪成像,常用的荧光素酶有细菌的荧光素酶基因操纵子(LuxCDABE),发光波长 490 nm;萤火虫荧光素酶(firefly luciferase,Fluc),分子量 60.6 kDa,发光波长 460 nm;海肾荧光素酶(renilla luciferase,Rluc),分子量 36.0 kDa,发光波长<500 nm 等[4, 8]。2012 年,Hall 从一种深海虾(*Oplophorus gracilirostris*)中发现了发光波长 454 nm 的荧光素酶(nanoLuc,Nluc),分子量仅 19.1 kDa,但其催化底物的效率比 Fluc 和 Rluc 高约 150 倍,发光强度高 100 倍[9]。将 Nluc 与两分子的橘红色荧光蛋白 CyOFP1 融合形成的 Antares 荧光素酶,通过生物发光能量转移可产生>600 nm 的光子,极大改善了体内成像效果[6]。将 Nluc 编码基因经过错配 PCR 分子进化,筛选到的突变体 TeLuc 与两分子 CyOFP1 构建的融合物 Antares2 催化底物 diphenylterazine (DTZ)发光效率又提高了 3.8 倍(相较于 Antares/DTZ 系统),在肿瘤细胞活体示踪成像中优势显著,但在细菌示踪中尚未见相关研究报道[6, 9]。本研究基于 Antares2 构建金葡菌生物发光示踪系统,通过构建稳定示踪菌株,遴选合适底物,探索金葡菌示踪系统的生物发光检测敏感性。

1 材料与方法

1.1 实验菌株、质粒与试剂

金葡菌 USA300(FPR3757)菌株由上海交通大学李敏教授惠赠,金葡菌 RN4220(NCTC 8325-4)以及大肠埃希菌-金葡菌穿梭质粒 pBT2 由中国科学技术大学孙宝林教授惠赠。DH5α 大肠埃希菌购于北京天根(Tiangen)公司。荧光素酶 Antares2 全长基因由华大基因合成并克隆至 pUC-*antares*2 质粒中。细菌基因组提取试剂盒、DNA 片段回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Promega 公司,Gibson 组装克隆试剂盒购自 NEB 公司;哥伦比亚血琼脂平板购自庞通医疗,细菌培养基 LB 和 TSB 购自 Oxoid 公司;furimazine (FUR)购自 Promega 公司;荧光素酶底物 DTZ 和 hydrofurimazine (HFZ)购自 MCE 公司。

1.2 金葡菌示踪菌株的构建

示踪菌的构建采用同源重组的方式进行[10]。烯醇酶编码基因 *eno* 是金葡菌中进化保守的基因,课题前期研究发现 Eno 是金葡菌内可靠的外源蛋白融合靶标[11]。因此,我们根据金葡菌 USA300 基因组序列(GenBank 登录号:CP014362.1)中 Eno 编码基因终止密码子的上、下游序列,设计 1 对引物 Up-eno-F3(5′-gagctcggtacccgggatgatcgcattagacggt-3′,下划线碱基为与 PBT2 质粒的同源序列)/Up-eno-R3 (5′-tgctcaccatttatctaagttatagaatgatttgataccg-3′,下划线碱基为与引物 eno-antares2-F3 的同源序列)用于 PCR 扩增左同源臂,再设计 1 对引物 Down-eno-F3 (5′-caagtgactcgagtttcttataatcaaatgctgac-3′,下划线碱基为与引物 eno-antares2-R3 的同源序列)/Down-eno-R3 (5′-gataaactaccgcattactgcttttaccttcttggagtag-3′,下划线碱基为与 PBT2 质粒的同源序列)扩增右侧同源臂。根据 pUC-*antares*2 质粒荧光素酶基因编码序列设计 1 对引物 eno-antares2-F3 (5′-cttagataaaatggtgagcaagggcgag-3′,下划线部分为与引物 Up-eno-R3 的同源序列)/eno-antares2-R3(5′-gaaaactcgagtcacttgtacagctcgtccatgc-3′,下划线部分为与引物 Down-eno-F3 的同源序列)用于扩增荧光素酶基因 *antares*2。将 PCR 扩增获得的同源左臂(Eno)、右臂(Down)及 Antares2 片段用琼脂糖凝胶回收后取等摩尔比例混合,利用各片段之间的同源序列,采用 Gibson 组装克隆试剂盒克隆到 pBT2 穿梭质

粒上,转化 DH5α 大肠埃希菌感受态,涂布 LB 平板(含氨苄青霉素 Amp100 μg/ml),37 ℃孵箱培养,第 2 日挑取单菌落于 LB 液体培养基中 37 ℃振荡培养后,制备重组质粒进行酶切鉴定,含有目标融合片段的重组质粒命名为 pBT2-*eno-antares*2。

将 pBT2-*eno-antares*2 质粒电转化入金葡菌 RN4220 中进行限制性修饰,再从中提取修饰后的质粒电转化入金葡菌 USA300 感受态细胞,涂布 TSB 平板(含氯霉素 Cm 20 μg/mL)。次日挑取单菌落接种于 TSB 培养基中,30 ℃振荡培养过夜,提取质粒再行酶切验证,获得转化菌。根据 pBT2 质粒的温敏特性,将转化菌接种到含 Cm 的 TSB 中,42 ℃培养过夜;次日,取菌液涂布含 Cm 的 TSB 平板,置 42 ℃培养;第 3 日挑取单菌落接种含 Cm 的 TSB 培养基,37 ℃培养后提取基因组,用引物对 Up-eno-F3/pBT2-PCR-R(5′-ccgggtaccgagctcg-3′)和 pBT2-PCR-F(5′-taatgcggtag-tttatcacagtt-3′)/Up-eno-R3 进行 PCR 扩增,确定是左同源臂,还是右同源臂发生了重组的菌株。取重组菌于 TSB 培养基(无抗生素)中 25 ℃培养 24 h,涂布于无抗 TSB 平板,37 ℃培养过夜,次日再挑取单菌落分别接种至含 Cm 及无抗生素的 TSB 平板上,37 ℃过夜培养,在氯霉素平板上不生长,而在无抗平板上生长者,为可疑的重组菌株,挑取可疑重组菌培养后提取基因组,用外侧引物 Up-eno-F3/Down-eno-R3 进行 PCR 扩增,鉴定发生双交换的菌株,并将扩增产物送 DNA 测序,序列正确的突变菌株即为示踪菌 USA300/Eno-Antares2。

1.3 USA300/Eno-Antares2 示踪菌株的 Western blot 鉴定

参考前期研究方法[7],将测序鉴定正确的 USA300/Eno-Antares2 示踪菌株及野生型 USA300 株碎菌后,提取菌体蛋白并进行 SDS-PAGE 电泳,然后通过半干转印系统蛋白质转印到 PVDF 膜上,用 anti-Eno 多克隆鼠抗体进行 Western blot 鉴定,实验重复 3 次。

1.4 金葡菌示踪菌的生长曲线测定

将示踪菌 USA300/Eno-Antares2 及野生型 USA300 株分别接种于含 2 mL TSB 培养基中于 37 ℃振荡培养过夜。次日,取过夜菌液按 1∶100 比例分别接种于含 50 mL TSB 培养基的锥形瓶(250 mL)中,37 ℃振荡培养,每小时取 1 mL 培养液于石英比色杯中,分光光度计检测光密度值 $D(600)$,检测至 24 h,实验重复 3 次。用 $D(600)$ 值与培养时间绘制生长曲线。

1.5 金葡菌溶血活性检测

取 USA300/Eno-Antares2 及野生型 USA300 的过夜培养菌液各 1 μL,加入至含 99 μL 无菌 PBS 缓冲液的 EP 管中,振荡混匀。取 10 μL 稀释菌液滴入血平板上,置于 37 ℃孵箱培养 24 h,取出血平板转移至 4 ℃冰箱,保存 12 h 后观察溶血情况并摄像。

1.6 金葡菌示踪菌株体外生物发光信号检测

将 USA300/Eno-Antare2 接种至 BHI 培养基于 37 ℃培养至 $D(600)$ 值为 2.0,10 000×*g* 离心 10 min 收集细菌细胞,用 PBS 缓冲液洗涤 1 次,再用 PBS 调整至每毫升含 1×10^9 菌落形成单位(colony forming unit, CFU)。在 3 支 0.2 mL Ep 管中分别加入 90 μL 示踪菌悬液,再分别加入 10 μL 底物溶液(DTZ、FUR 和 HFZ,每个浓度 3 mmol/L),混匀后,在暗室中肉眼观察发光信号,并使用 V40 数码相机进行摄像。

为检测示踪菌催化不同底物的发光强度差异,在 96 孔板中加入 1×10^7 CFU/mL 的示踪菌悬液 50 μL/孔,再每孔加入等体积含不同浓度(3.125、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L)的底物 DTZ,PUR 或 HFZ 溶液后混匀。将 96 孔板置生物发光检测仪 IVIS® Lumina LT system 上进行总发光强度检测,读取每孔的生物发光强度。

1.7 金葡菌示踪菌体外生物发光敏感性分析

为分析示踪金葡菌发光信号与细菌数量之间的相关性,将 USA300/Eno-Antares2 接种至 TSB 培养基进行培养,次日收集细菌,用 PBS 稀释并制备成 1×10^2、2×10^3、2×10^4、2×10^5、2×10^6CFU/mL 等 5 个不同浓度的细菌悬液。分别取 50 μL 细菌溶液与 50 μL HFZ 底物(100 μmol/L)混合并加入 96 孔板中,使用 IVIS® Lumina LTsystem 采集发光图像和信号。绘制示踪菌总发光强度与细菌数量关系曲线,分析金葡菌示踪敏感性。

1.8 金葡菌示踪菌小鼠体内生物发光敏感性分析

雌性 BALB/c 小鼠购自陆军军医大学实验动物中心。细菌感染的实验设计、实验过程及动物处死方式经过陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会审核,批准号为 SYXK-YU-20170002,符合动物伦理和动物福利要求。

为探究金葡菌示踪系统 USA300/Eno-Antares2/HFZ 在小鼠中的发光成像敏感性,BALB/c 小鼠分为 6 个剂量组($n=3$),先用 1%(m/v)戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,再用 6%(m/v)硫化钠按文献[7]报道的方法进行背部脱毛。次日,将 50 μL 分别含 10^1、10^2、10^3、10^4、10^5 CFU 示踪菌 USA300/Eno-Antare2 和 50 μL 底物 HFZ(100 μmol/L)混合物经皮下注射到小鼠背部皮下。以 10^5 CFU 野生型 USA300 细菌+HFZ 底物注射小鼠作为阴性对照。注射 1 min 后使用 IVIS® Lumina LT 系统测量小鼠发光信号。皮肤生物发光成像的灵敏度下限描述为感染小鼠皮肤中

仍能发出生物发光信号的最低示踪细菌 CFU。

1.9 统计学分析

采用 GraphPad prism 9.0 软件对示踪菌催化不同浓度不同底物发光强度数据进行统计学处理,总发光强度数据以 $\log_{10}$(p/s)平均值±标准差表示,采用单因素方差分析,检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 金葡菌示踪菌株的构建与鉴定

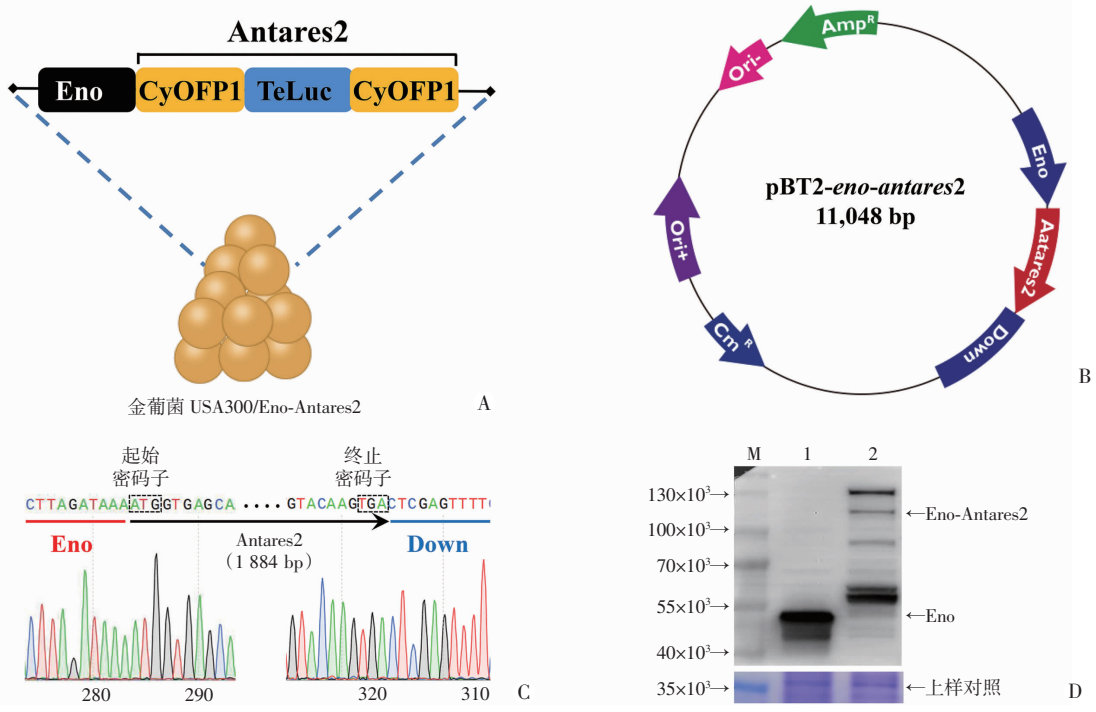
以金葡菌 USA300 菌株为出发菌[10],将包含同源重组左臂 Eno,Antares2 基因和同源重组右臂 Down 片段通过同源重组克隆到 pBT2 质粒上[7],将荧光素酶 Antares2 基因插入到细菌基因组烯醇酶编码基因 *eno* 终止密码子之前,与 Eno 形成融合蛋白,具体构建策略如图 1A 所示。构建目标基因敲入质粒(图 1B)。将该质粒转化入金葡菌 USA300 菌株中,利用 pBT2 质粒的温敏特性及氯霉素抗性,通过 30 ℃和 42 ℃交替培养,最后筛选氯霉素敏感的菌落,提取其基因组,PCR 扩增含目标基因的片段进行测序鉴定,结果如图 1C 所示,可见荧光素酶 Antares2 基因与 Eno 正确融合。为进一步探究目标融合基因是否能表达,采用 Western blot 对 Eno-Antares2 融合蛋白进行检测,结果如图 1D 所示,与野生型 USA300 菌株相比,USA300/Eno-Antares2 菌株中目标蛋白增加约 70 kDa,与荧光素酶 Antares2 的理论分子量 71.9 kDa 相当,表明金葡菌示踪菌株 USA300/Eno-Antares2 构建成功。

2.2 金葡菌示踪菌株生长曲线及溶血活性

为探究荧光素酶基因敲入对金葡菌菌株生物学特性的影响,首先对细菌的生长曲线进行了测定,结果如图 2A 所示,可见在培养 24 h 内,示踪菌 USA300/Eno-Antares2 的生长与野生型菌株 USA300 无明显差异。溶血活性检测显示,示踪菌 USA300/Eno-Antares2 与野生型菌株 USA300 也无显著性差异(图 2B),表明荧光素酶基因 Antares2 的敲入对金葡菌示踪菌株的生长和溶血性能无明显影响,该示踪菌可用于细菌感染等研究。

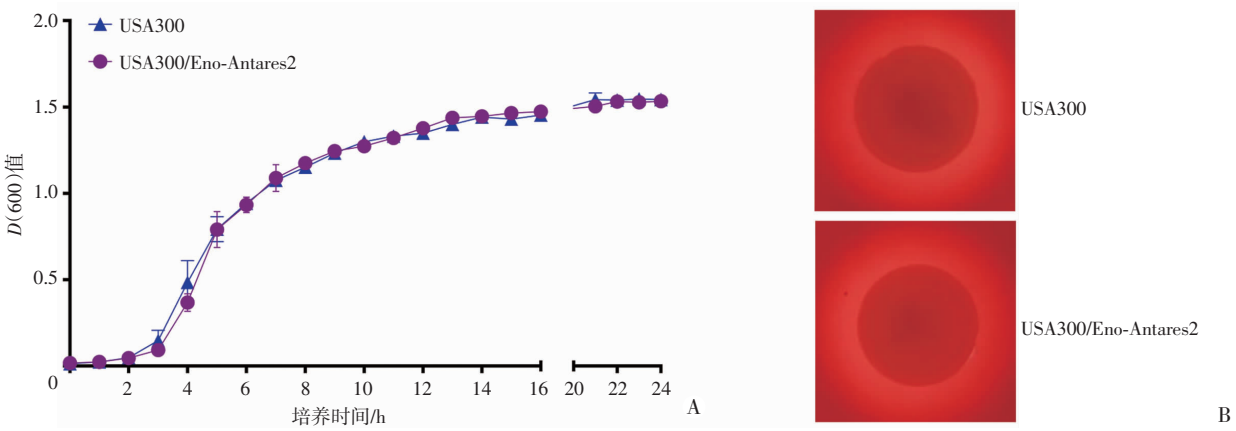
2.3 示踪菌体外生物发光检测

荧光素酶通过催化底物发光,底物不同则发光强度会有所不同[12]。将培养至对数生长期(OD600 = 1.0)的金葡菌 USA300/Eno-Antarces2 悬液与等体积底物 DTZ, FUR 或 HFZ 进行混合,暗室中即可肉眼观察到发光(图 3A),且示踪菌与 HFZ 组合的示踪系统发光最亮。进一步采用生物发光成像仪进行检测,结果发现随着底物浓度降低,示踪菌 USA300/Eno-Antarces2 在 25 μmol/L DTZ 底物中发光强度显著下降(图 3B、C),在 12.5 μmol/L FUR 底物中发光强度也显著下降,而在低至 3.125 μmol/L HFZ 底物中仍能检测到较强发光。示踪菌催化 HFZ 底物发光在每个浓度梯度均显著强于 DTZ 和 FUR 底物。这些结果表明,金葡菌 USA300/Eno-Antarces2/HFZ 生物发光体系的效率最高,可用于示踪研究。



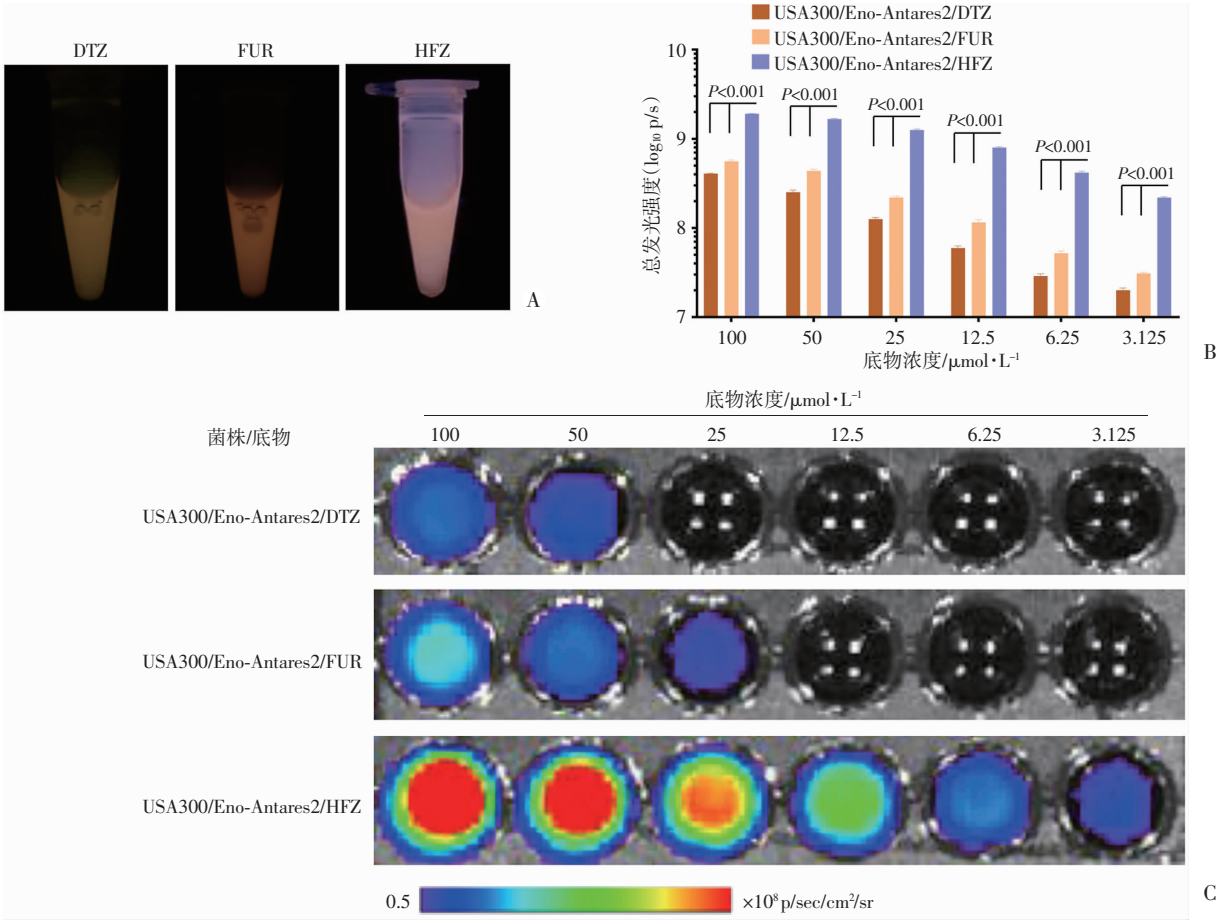
A:金葡菌示踪菌构建示意图;B:基因敲入质粒;C:示踪菌的测序鉴定;D:示踪菌的 Western blot 鉴定 Eno:多克隆抗体;M:蛋白分子量标准;1:USA300 菌株;2:USA300/Eno-Antares2

图 1 金葡菌 USA300/Eno-Antarces2 示踪菌的构建与鉴定



A:细菌生长曲线;B:细菌溶血活性

图 2 示踪菌 USA300/Eno-Antarces2 的生长曲线和溶血活性

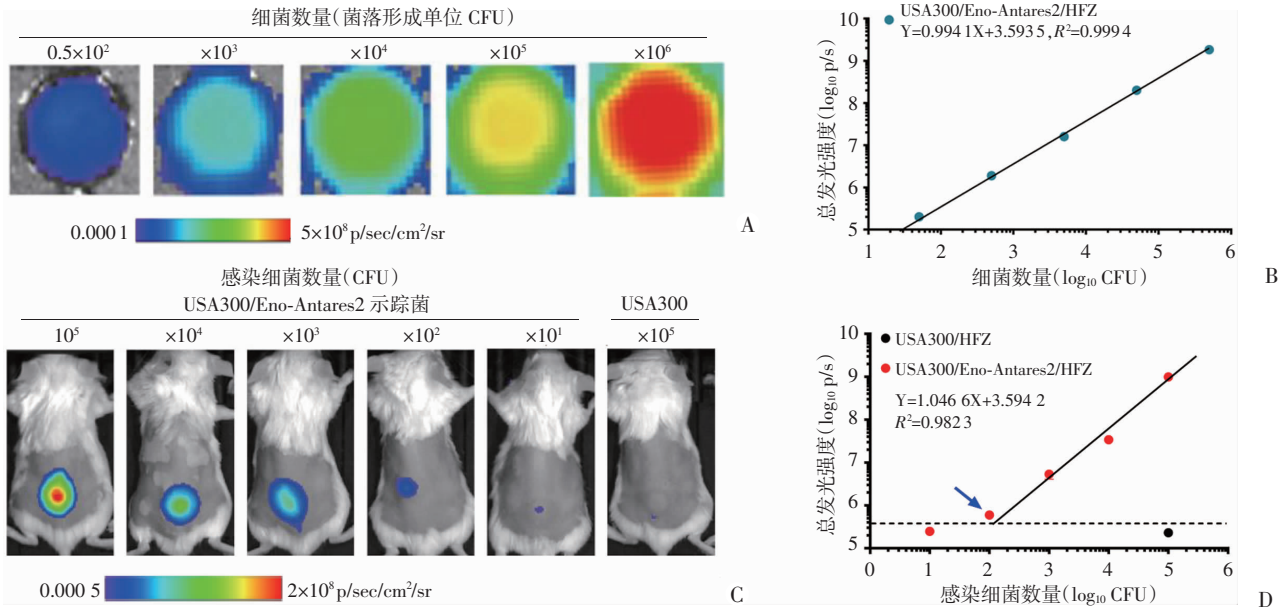


A:示踪菌催化不同底物发光的肉眼观察;B:不同底物浓度的发光强度比较;C:不同底物浓度的发光强度检测

图 3 示踪菌 USA300/Eno-Antarces2 催化不同底物的发光强度分析

2.4 金葡菌 USA300/Eno-Antarces2/HFZ 示踪系统的敏感性及体内生物发光检测

将不同数量的示踪菌(0.5×10^2、10^3、10^4、10^5、10^6 CFU)分别与 100 μmol/L 的 HFZ 底物进行混合,用生物发光仪进行总发光强度检测,结果如图 4A 所示,可见 50 个细菌即可检测到明显的发光信号。示踪菌以 HFZ 为底物,总发光强度的对数与细菌数量的对数呈现很好的线性关系(图 4B),决定系数 R^2=0.999 4,体外检测敏感性为 50 CFU。



A:示踪系统体外敏感性分析;B:示踪系统体外检测的线性关系;C:示踪菌感染小鼠的敏感性检测;D:示踪菌感染小鼠敏感性的线性关系

图 4 示踪系统 USA300/Eno-Antarces2/HFZ 的敏感性分析

将不同数量的示踪菌(10^1、10^2、10^3、10^4、10^5 CFU)分别与 100 μmol/L 的 HFZ 底物混合后注射到 BALB/c 小鼠皮下,生物发光仪进行总发光强度检测。结果如图 4C 所示,与感染 10^5 CFU 野生型 USA300 对照组相比,10^1 CFU 示踪菌即可检测到较弱的发光信号,感染 10^2 CFU 示踪菌可催化底物产生稳定发光信号。示踪菌总发光强度的对数与 10^2~10^5 CFU 细菌数量的对数呈现很好的线性关系(图 4D),相关系数 $R^2=0.982\ 3$,小鼠体内示踪检测敏感性为 100 CFU。

3 讨论

自从萤火虫发光系统被发掘以来,生物发光的应用涉及动物活体示踪成像、生物传感、毒性物质测定、病原体快速检测、细菌总数测定等领域[13]。在已开发的 40 余套荧光素酶/底物系统中,融合型荧光素酶 Antares2 是目前催化底物效率最高,发光最强的系统[6,12]。其核心荧光素酶分子 TeLuc 是在深海虾荧光素酶 Nluc 的基础上经过错配 PCR 突变并筛选获得的有 3 个氨基酸突变(Asp19Ser, Asp85Asn 和 Cys164His)的分子[6],其催化底物 DTZ 发射的 454 nm 青蓝色光可被与其融合的 CyOFP1 荧光蛋白吸收,发生生物发光能量转移,产生 589~620 nm 光,其中>600 nm 光子产生的能力是野生型 Nluc 的 3.8 倍,为萤火虫荧光素酶系统 Fluc/D-荧光素的 65 倍,尤其适合生物细胞的体内示踪[6,8]。

生物发光示踪细菌的构建通常采用质粒对荧光素酶进行表达。如最早的研究就是将发光细菌(*Photorhabdus luminescence*)的 LuxCDABE 系统克隆到 pCGSL1 质粒上,再转化伤寒沙门氏菌并实现体内示踪[14]。2003 年,KADURUGAMUWA 等[15]将 Lux 操纵子克隆到转座子质粒 pAUL-ATn 中,转化金葡菌 ATCC 12600 菌株,获得生物发光金葡菌 Xen 29。但质粒在无抗生素选择压力下极易丢失,导致示踪失败。为获得稳定的金葡菌示踪菌株,本研究采用基因敲入的方法,将 Antares2 编码基因插入金葡菌 USA300 基因组烯醇酶编码基因 *eno* 的终止密码子之前,与 *eno* 形成融合蛋白。选择 *eno* 作为融合靶标主要基于 2 点考虑:一是烯醇酶作为金葡菌代谢关键功能酶,其表达稳定;二是前期有研究证实,在该分子后融合异源分子不会影响金葡菌生长[7]。正如设计所预期,在将 Antares2 基因成功敲入目标位置构建 USA300/Eno-Antares2 工程菌后,菌株的生长曲线和溶血活性与野生型 USA300 菌株无明显差异,可以用于细菌感染等研究。

荧光素酶通过催化底物发光,不同荧光素酶的底物不同,同一种酶催化不同底物的发光性能也会有差异。Antares2 的底物通常是水母腔肠素类似物 DTZ[9]和咪唑吡嗪酮 FUR[4],这 2 种底物的溶解性不好,生

物利用度较差。2020 年,SU 等[12]以 FUR 为骨架,构建并筛选出了水溶性好的底物羟化物 HFZ。本研究构建的示踪菌株 USA300/Eno-Antares2 对上述 3 种底物都能进行催化并发光,且产生的光在暗室中肉眼即可观察到。相比较而言,USA300/Eno-Antares2/HFZ 的发光最亮,是良好的示踪系统。应用该系统进行发光检测,体外检测的敏感性为 50 CFU。利用 BALB/c 小鼠进行示踪系统体内的发光敏感性检测,敏感性为 100 CFU,该敏感度值要比文献报道的基于甲虫荧光素酶 Luc/D-luciferin 的金葡菌系统(3×10^4CFU)高约 300 倍[16]。

综上所述,本研究成功构建了基于融合型荧光素酶 Antares2 金葡菌示踪菌株,通过催化不同底物生物发光的比较和筛选,获得的 USA300/Eno-Antares2/HFZ 金葡菌示踪系统的检测性能好,检测敏感性佳,为后续开展金葡菌感染及体内示踪研究奠定了基础。

参考文献:

[1] WANG S, HUANG X, YANG J, *et al*. Biocontrol of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a virulent bacteriophage derived from a temperate one[J]. Microbiol Res, 2023, 267: 127258. DOI: 10.1016/j.micres.2022.127258.

[2] IVANOVIC I, BOSS R, ROMANÒ A, *et al*. Penicillin resistance in bovine *Staphylococcus aureus*: Genomic evaluation of the discrepancy between phenotypic and molecular test methods[J]. J Dairy Sci, 2023, 106(1): 462-475. DOI: 10.3168/jds.2022-22158.

[3] MARRA A. Animal models for drug development for MRSA[J]. Methods Mol Biol, 2020, 2069: 253-266. DOI: 10.1007/978-1-4939-9849-4_17.

[4] ZAMBITO G, CHAWDA C, MEZZANOTTE L. Emerging tools for bioluminescence imaging[J]. Curr Opin Chem Biol, 2021, 63: 86-94. DOI: 10.1016/j.cbpa.2021.02.005.

[5] LUKYANOV K A. Fluorescent proteins for a brighter science[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 633: 29-32. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.08.089.

[6] YEH H W, KARMACH O, JI A, *et al*. Red-shifted luciferase-luciferin pairs for enhanced bioluminescence imaging[J]. Nat Methods, 2017, 14(10): 971-974. DOI: 10.1038/nmeth.4400.

[7] SHANG W L, RAO Y F, ZHENG Y, *et al*. β-lactam antibiotics enhance the pathogenicity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus via* SarA-controlled lipoprotein-like cluster expression[J]. mBio, 2019, 10(3): e00880-e00819. DOI: 10.1128/mBio.00880-19.

[8] CHU J, OH Y, SENS A, *et al*. A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging *in vivo*[J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(7): 760-767. DOI: 10.1038/nbt.3550.

[9] HALL M P, UNCH J, BINKOWSKI B F, *et al*. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate[J]. ACS Chem Biol, 2012, 7(11): 1848-1857. DOI: 10.1021/cb3002478.

[10] 饶一凡, 毛旭虎, 彭华刚, 等. WalK(S221P)突变影响万古霉素中等耐药金黄色葡萄球菌毒力的作用[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(3): 219-228. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201910057.
RAO Y F, MAO X H, PENG H G, *et al*. Role of WalK (S221P) mutation on virulence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and underlying mechanism[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(3): 219-228. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201910057.

[11] YUAN J Z, YANG J, HU Z, *et al*. Safe staphylococcal platform for the development of multivalent nanoscale vesicles against viral infections[J]. Nano Lett, 2018, 18(2): 725-733. DOI: 10.1021/acs.nanolett.7b03893.

[12] SU Y C, WALKER J R, PARK Y, *et al*. Novel NanoLuc substrates enable bright two-population bioluminescence imaging in animals[J]. Nat Methods, 2020, 17(8): 852-860. DOI: 10.1038/s41592-020-0889-6.

[13] FLEISS A, SARKISYAN K S. A brief review of bioluminescent systems (2019)[J]. Curr Genet, 2019, 65(4): 877-882. DOI: 10.1007/s00294-019-00951-5. [LinkOut]

[14] CONTAG C H, CONTAG P R, MULLINS J I, *et al*. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts[J]. Mol Microbiol, 1995, 18(4): 593-603. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18040593.x.

[15] KADURUGAMUWA J L, SIN L, ALBERT E, *et al*. Direct continuous method for monitoring biofilm infection in a mouse model[J]. Infect Immun, 2003, 71(2): 882-890. DOI: 10.1128/IAI.71.2.882-890.2003.

[16] MILLER R J, CROSBY H A, SCHILCHER K, *et al*. Development of a *Staphylococcus aureus* reporter strain with click beetle red luciferase for enhanced *in vivo* imaging of experimental bacteremia and mixed infections[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 16663. DOI: 10.1038/s41598-019-52982-0.

(**收稿**:2022-12-27;**修回**:2023-01-17)

(编辑 邓强庭)