DOI:10.16016/j.2097-0927.202309117

WalK(S221P)突变促进金黄色葡萄球菌荚膜产生的作用研究

郭祖文[1],饶一凡[2],彭华刚[1],饶贤才[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];400030 重庆,重庆大学生物工程学院[2]

[**摘要**] **目的** 探究 WalK(S221P)突变促进金葡菌荚膜产生的作用及可能机制。**方法** 采用转录组测序(RNA-seq)分析 WalK(S221P)突变对金葡菌基因表达的影响,采用 RT-qPCR 检测荚膜合成基因的表达变化。利用荚膜染色和透射电镜观察确认 WalK(S221P)突变促进金葡菌荚膜产生的作用,再用 RT-qPCR 筛选参与介导 WalK(S221P)促进荚膜合成的调控分子,通过结合位点分析和凝胶迁移阻滞实验(EMSA)证实 WalKR 对目标分子的调控作用。**结果** RNA-seq 分析显示 WalK(S221P)突变对 196 个金葡菌基因的表达水平影响显著,其中 16 个荚膜合成操纵子基因在 XN108 中的表达均显著上调。RT-qPCR 检测显示荚膜合成相关 *capA*, *capH* 和 *capK* 在含有 WalK(S221P)突变的 XN108 及 K-Newman 菌株中分别较回复株 XN108-R 和野生型 Newman 菌株显著上调。荚膜染色和透射电镜观察显示 XN108 的荚膜合成相比于回复株 XN108-R 明显增多,增厚。RT-qPCR 筛选提示 WalK(S221P)促进金葡菌荚膜合成可能是通过上调 MgrA 表达水平实现的,结合位点检索分析及 EMSA 实验证实 WalK 激活的 WalR 具有直接结合 *mgrA* 基因调控区的功能。**结论** 金葡菌 WalK(S221P)突变具有促进金葡菌荚膜产生的作用,该作用的发挥可能通过上调 MgrA 的表达而实现。

[**关键词**] 金黄色葡萄球菌;荚膜;二元调控系统 WalKR;WalK(S221P);MgrA
[**中图法分类号**] R372; R378.11; R394.3 [**文献标志码**] A

WalK(S221P) mutation promotes production of *Staphylococcus aureus* capsule

GUO Zuwen[1], RAO Yifan[2], PENG Huagang[1], RAO Xiancai[1] [1]Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing, 400030, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role and possible mechanism of WalK(S221P) mutation in promoting capsule production of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). **Methods** RNA sequencing (RNA-seq) was performed to detect the effect of WalK(S221P) mutation on gene expression of *S. aureus* strain XN108. RT-qPCR was used to verify the capsule gene variation caused by WalK(S221P) mutation. Capsule staining and transmission electron microscopy (TEM) were employed to determine capsule biosynthesis of *S. aureus*. The possible regulatory genes involved in WalK(S221P) regulation were screened by using RT-qPCR. The binding site of WalKR on the regulatory regions of *mgrA* gene was predicted, and electrophoresis mobility shift assay (EMSA) was conducted to detect the direct binding activity of WalK-activated WalR on the *mgrA* DNA probe. **Results** RNA-seq revealed that the expression of 196 genes altered after WalK(S221P) mutation in *S. aureus* XN108, and among these genes, 16 genes involved in capsule biosynthesis were upregulated remarkably. RT-qPCR confirmed the upregulation of *capA*, *capH*, and *capK* in the WalK(S221P)-carried *S. aureus* strains, including XN108 and K-Newman. Capsule staining showed that XN108 had more capsule production than its counterpart XN108-R. TEM observation demonstrated that XN108 had thicker capsule than

[**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/)

XN108-R. RT-qPCR indicated an increasing expression of *mgrA* gene in the WalK(S221P)-carried XN108 when compared with that in XN108-R. A putative binding site of WalR on the regulatory regions of *mgrA* gene was predicted, and the direct binding activity of WalK-activated WalR on the *mgrA* regulatory fragment was verified by EMSA. **Conclusion** WalK(S221P) promotes the production of *S. aureus* capsule, and the underlying mechanism might be associated with the upregulation of MgrA, a positive regulator for *S. aureus* capsule biosynthesis.

[**Key words**] *Staphylococcus aureus*; capsule; two-component system WalKR; WalK(S221P); MgrA

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)是临床感染的重要机会致病菌,既可引起皮肤/软组织感染、肺炎、心肌炎、食物中毒、脓毒症等疾病,也可在新冠、流感等病毒性疾病中继发感染[1-3]。在美国,金葡菌感染导致的死亡病例超过艾滋病和肝炎死亡的总和[4];在我国,金葡菌的临床分离率长期稳居革兰氏阳性菌首位。据中国耐药监测网 2022 年度报告,金葡菌的分离率占临床病原性细菌总分离率的 9.47%,仅次于革兰氏阴性大肠埃希菌(18.69%)和肺炎克雷伯菌(13.99%),位列临床分离菌第三位,革兰阳性菌分离率第一位(http://www.chinets.com/Document)。深入阐明金葡菌的致病机制,对建立新型防控金葡菌感染策略具有重要意义。

荚膜(capsule)是金葡菌致病的重要毒力因子之一,具有抗吞噬和促进细菌免疫逃逸的功能[5]。研究表明,金葡菌可自行调节荚膜的产生和水平,以适应不同环境的生存需求[6]。如超过 80%的金葡菌能在体内感染过程中产生荚膜,而在体外培养时则荚膜产生下降[7]。金葡菌荚膜为氨基己糖醛酸和单糖分子规则重复亚单位组成的一种线性多糖,结构复杂而多样,分子量 100~2,000 kDa,至少有 11 种血清型[6]。临床分离菌株主要产生 5 型和 8 型荚膜[7]。金葡菌荚膜的合成受 16 个基因(*capA*-*capP*)组成的 *cap* 操纵子控制,这些功能基因的编码产物参与单糖分子添加、多糖乙酰化、转运等荚膜合成过程[6]。调控金葡菌荚膜合成之 *cap* 操纵子表达的因子较多,如转录因子 MgrA,SpoVG 和 RbsR 可正调控 *cap* 操纵子的表达,而 Rot,CodY 和 SaeSR 则发挥抑制 *cap* 基因的功能[8]。如此复杂的调控机制,一方面表明荚膜在金葡菌生长繁殖和免疫逃逸中具有重要意义;另一方面说明金葡菌可及时调整荚膜的合成以适应环境,体现了该菌极强的环境适应能力。

我们在前期工作中分离鉴定了一株万古霉素中等耐药金葡菌(vancomycin-intermediate *S. aureus*,VISA),该菌株也是甲氧西林耐药菌(methicillin-resistant *S. aureus*,MRSA),命名为 XN108[9]。进一步研究发现二元调控系统(two-component system,TCS)元件 WalK(S221P)突变是 XN108 耐受万古霉素的关键机制[10]。有意义的是,将耐药菌 XN108 菌株中的 WalK(S221P)突变回复后,RNA-seq 分析表明野生株与突变回复菌株 XN108-R 相比,荚膜合成基因表达显著上调。本研究对 WalK(S221P)突变促进金葡菌荚膜合成的作用进行了探讨,并初步探索了可能的调控机制,为深入阐明 WalK(S221P)突变对金葡菌致病性的影响奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 金葡菌菌株与试剂

金葡菌 VISA 及 MRSA 菌株 XN108(荚膜 8 型)由本室分离并保存[9],甲氧西林敏感(methicillin-susceptible *S. aureus*,MSSA)金葡菌 Newman(NCTC 8178,荚膜 5 型)由吉林大学于录教授惠赠。WalK(S221P)突变回复菌株 XN108-R 及突变引入菌株 K-Newman 由本室构建[10]。细菌基因组提取试剂盒及 RNA 逆转录试剂盒购自 Promega 公司,RNA 提取试剂盒购自天根公司,荚膜染色试剂盒购自 Solarbio 公司;金葡菌脑心浸液(brain heart infusion,BHI)培养基购自 Oxoid 公司。重组蛋白 WalK 和 WalR 由本室制备并保存[10]。

1.2 转录组测序

为探讨 WalK(S221P)突变对金葡菌基因表达的影响,我们对 XN108 及其突变回复菌株 XN108-R 进行转录组测序(RNA sequencing,RNA-seq)。将金葡菌接种于 BHI 液体培养基置于 37 ℃过夜振荡培养。次日按 1∶100 比例转种于新鲜 BHI 培养基,在细菌生长对数早期(培养 6 h,OD600 值约为 1.0),5 000×*g* 于 4 ℃离心 10 min 收集菌体,用 RNAprep 试剂盒提取细菌总 RNA,设置 3 个生物学样本重复。收集的样本送北京 Novogene 公司建库并采用 Illumina HiSeqTM2500 进行 RNA-seq。测序原始数据存储于 GEO DataSets 公

共数据库,检索号为 GSE127706。菌株间差异表达基因采用 DESeq version 1.10.1 软件进行分析,遴选差异 2 倍以上的基因进行深入分析。

1.3 RT-qPCR 检测

根据金葡菌 XN108 基因组(GenBank 登录号:CP007447.1)中目标基因序列设计 RT-qPCR 引物,具体目标基因及引物序列如表 1 所示。培养金葡菌,提取总 RNA,再用逆转录试剂盒参照说明书进行 RNA 逆转录,随后用设计的引物进行 PCR 扩增,以金葡菌保守的 *gyrB* 基因为内参,各基因对内参基因的相对表达水平纳入最后分析。

表 1 目标基因的 RT-qPCR 检测引物

基因名称	引物序列(5′-3′)	扩增长度
capA	上游:AATTATTAGCGCTATTGTTACATTTTTCG 下游:CATTTAAGTCCTTTGACACCTCATCT	200 bp
capH	上游:AATCGTTGATGCTAGCAGGCTG 下游:CCAATAAAACCTATATTAATTGGCCAT	171 bp
capK	上游:AATCATCACTACCCCAATTATTACAAGAC 下游:TTGTGAAAGTATATTAGCACTACGGTCATT	166 bp
mgrA	上游:ATCAAATGCATGAATGACTTTACCTAAT 下游:CCGAAGTCGATCAACGTGAAGTAT	167 bp
saeR	上游:CGCCTTAACTTTAGGTGCAGATGAC 下游:ACGCATAGGGACTTCGTGACCATT	196 bp
saeS	上游:CACCTTTAGCAAGCATTATTTCATATTCTGAAG 下游:GTAATTGGTCTAGTTGTATTAATTCTGGGGG	201 bp
rot	上游:TCAGCGAGATTGAAAGCGAATAC 下游:CTGTCCATTTCTTTAAGCGTCATAG	100 bp
spoVG	上游:CGTAATTCATGATTTACGTGTAATTGAAGGA 下游:CTGAATCTTCTGATGTAGCGTTTTTATCT	206 bp
rbsR	上游:GATGGCGAATATGTCGACTCG 下游:CTGATGCCATGTTCAATTAGTCCTC	213 bp
codY	上游:GTATTTATTGTATCGCGTCGAGGTAA 下游:ATGAATAATTCTCTGTTTTCAGGTGGG	206 bp
gyrB(内参)	上游:AAATCGCCTGCGTTCTAGAG 下游:CCAGGTAAATTAGCCGATTGC	121 bp

1.4 荚膜染色

取金葡菌 XN108 及 XN108-R 的过夜培养物进行涂片,自然干燥后,用细菌荚膜染色试剂盒进行染色。具体方法为:在固定好的标本上滴加结晶紫染液,染色 5~7 min 后,用硫酸铜溶液冲洗涂片 2~3 次,用吸水纸吸干,滴加香柏油于涂片处,在奥林帕斯显微镜(Olympus BX53)下进行观察并摄像。

1.5 透射电镜观察

挑取 BHI 平板上生长的 XN108 及 XN108-R 单菌落接种于 2 mL BHI 液体培养基中,37 ℃,200 rpm,振荡培养过夜。次日取过夜培养菌液按 1∶100 比例接种到 2 mL 新鲜的 BHI 培养基中,37 ℃振荡培养 6 h,取 500 μL 培养菌液于无菌 EP 管中 5 000×*g* 离心 30 min,弃上清。在细菌沉淀中加入 1 mL 2.5%戊二醛进行固定,4 ℃冰箱中静置过夜,将固定后的样品送大学分析测试中心制作电镜切片,采用 TECNAI10 透射电子显微镜(Philips)进行观察,选取合适的视野进行摄像。

1.6 调控因子结合位点分析

据文献报道,WalKR 是金葡菌生长唯一必需的 TCS[11],其效应分子 WalR 通过识别下游靶基因启动子区的“5′-TGTWAH-N5-TGTWAH-3′”(W 和 H 为任一碱基)顺式反应元件而发挥调控功能[12]。我们在金葡菌荚膜操纵子 *capA* 基因上游 500bp 的调控区域内进行检索,分析可能的调控位点。如果发生间接调控,则对可疑目标分子编码基因的调控区进行检索,分析可能的结合位点,为后续开展 EMSA 实验奠定基础。

1.7 EMSA 实验

凝胶迁移阻滞实验(Electrophoretic Mobility Shift Assay,EMSA)是检测转录因子结合 DNA 能力的有效方法[10]。根据 XN108 基因组中可疑目标基因 *mgrA* 的上游编码序列(含预测的 WalKR 调控位点)设计一对探针引物,其中一条上游引物用生物素进行标记(表 2),另设计一对引物扩增 125 bp 的金葡菌 DNA 片段作为无关探针对照。常规培养金葡菌 XN108,采用基因组提取试剂盒制备细菌基因组 DNA;以此为模板,用 *mgrA*-5-biotin/*mgrA*-3 引物扩增标记探针,以无生物素标记的 *mgrA*-5/*mgrA*-3 引物扩增竞争性探针,以 *hu*-5/*hu*-3 引物扩增 *hu* 基因(编码未知 DNA 结合蛋白)片段作为无关对照探针。

参照文献报道的方法[10],体外用实验室前期制备的 WalK 激活不同剂量的 WalR 重组蛋白,将标记的 *mgrA* 探针与上述激活的不同浓度的 WalR 效应蛋白在体外进行结合反应;同时设置加入 300 倍剂量的无关 *hu* 探针为阴性对照,加入 300 倍剂量的未标记 *mgrA* 探针作为阳性竞争对照。反应结束后,将样品进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,观察 DNA 探针迁移阻滞现象,判断 WalKR 对目标基因启动子区的直接结合能力。

表 2 EMSA 探针的扩增引物

探针引物名称	引物序列(5′-3′)	扩增长度
mgrA-5-biotin	TTTATATTCTCTTTTCTATTACAGTTATTTTTAAA	227 bp
mgrA-5	TTTATATTCTCTTTTCTATTACAGTTATTTTTAAA	227 bp
mgrA-3	TAAAGTTCTCCTCCAGACATACTATCC	
hu-5	AAAAAGAAGCTGGTTCAGCAGTAG	125 bp
hu-3	TTTACGTGCAGCACGTTCAC	

1.8 统计学处理

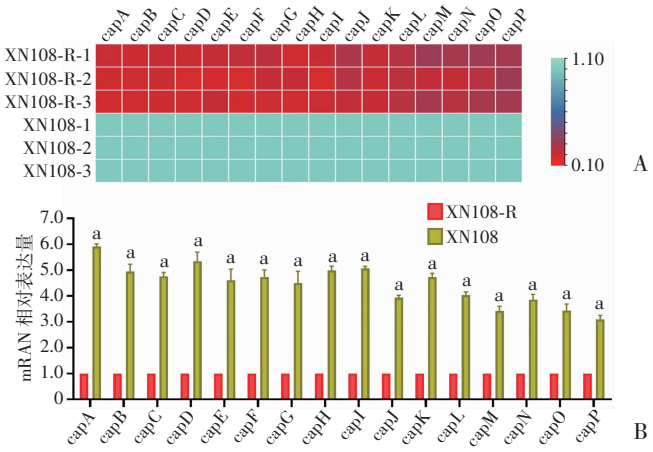
采用 GraphPad Prism 9.0 软件对差异表达基因的数据进行统计学处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方

差分析,检验水准 $P=0.05$。

2 结果

2.1 金葡菌 WalK(S221P)突变导致荚膜基因簇表达上调

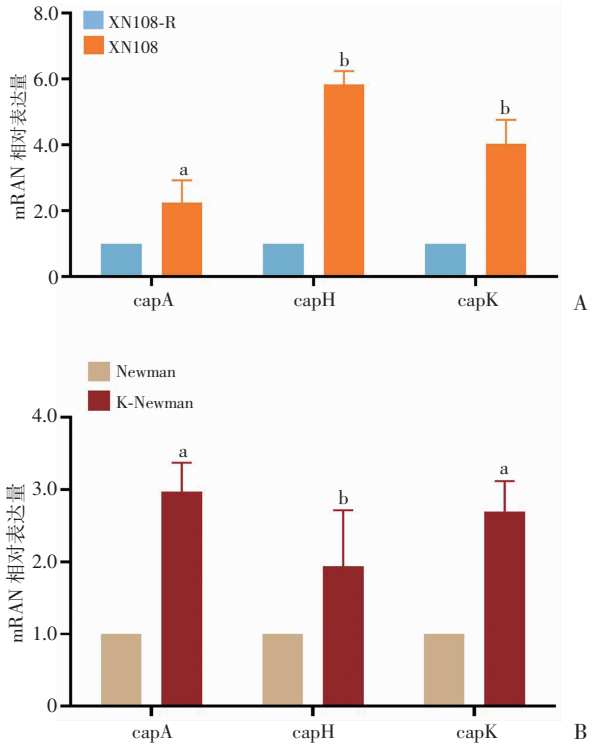
WalK(S221P)突变是金葡菌 VISA 菌株 XN108 耐受万古霉素的重要原因[10],将该突变回复为正常基因型 WalK(P221S)后导致回复菌株 XN108-R 的万古霉素 MIC 从野生株的 12 μg/mL 下降为 4 μg/mL[10]。为探讨 WalK(S221P)突变对金葡菌基因表达的影响,我们对 XN108 和 XN108-R 进行了转录组测序和分析。结果发现,相较于回复菌株 XN108-R,野生型菌株 XN108 有 120 个基因发生 2 倍以上的表达下调,76 个基因表达上调;在这些上调的基因中,金葡菌荚膜操纵子中 16 个基因的表达水平均显著上调($P<0.001$),平均上调 4.54(3.26~5.95)倍(图 1)。



A:热图显示金葡菌荚膜 *cap* 操纵子基因在 XN108 和 XN108-R 中的表达水平,-1, -2, -3 表示 3 个生物学重复样本;B:16 个荚膜 *cap* 基因在野生株 XN108 相较于 WalK(S221P)突变回复株 XN108-R 的表达倍数变化,将每个目标基因在 XN108-R 中的平均表达水平调整为 1,该基因在 XN108 中的相对表达水平如图所示($n=3,\bar{x}\pm s$),与在 XN108-R 中的表达水平相比,a: $P<0.001$

图 1 RNA-seq 分析金葡菌 XN108 与 XN108-R 中荚膜操纵子基因的表达变化

为验证 RNA-seq 的检测结果,采用 RT-qPCR 检测了荚膜合成 *capA*, *capH* 和 *capK* 在 XN108 和 XN108-R 中的表达水平,结果显示 3 个基因相对于 *gyrB* 内参的表达水平在 XN108(产 8 型荚膜)中显著升高(图 2A)。接着,采用 RT-qPCR 检测了上述荚膜合成基因在 MSSA 菌株 Newman(产 5 型荚膜)及含 WalK(S221P)突变的 K-Newman 中的表达差异。结果如图 2B 所示,*capA*, *capH* 和 *capK* 在 K-Newman 中的表达水平相较于野生株 Newman 也显著升高。上述结果表明,WalK(S221P)突变具有促进金葡菌荚膜合成基因表达上调的作用。

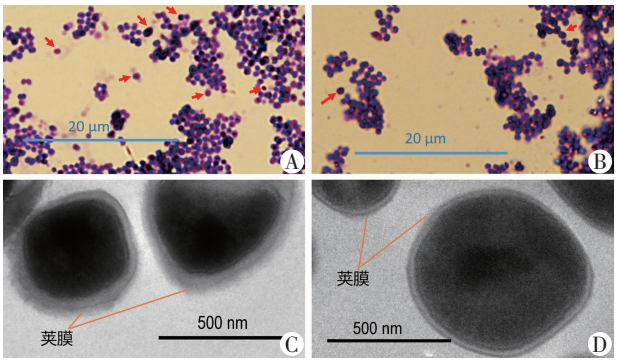


A:荚膜合成基因在 XN108 相对于 XN108-R 中的表达变化,将目标基因与内参基因 *gyrB* 在回复株 XN108-R 中的平均相对表达水平调整为 1,该基因在 XN108 中的相对表达水平如图所示($n=3,\bar{x}\pm s$),与在 XN108-R 中的表达水平相比,a: $P<0.01$, b: $P<0.001$;B:在 Newman 菌株中引入 WalK(S221P)突变对荚膜基因表达的影响。将每个目标基因与内参基因 *gyrB* 在 Newman 中的相对平均表达水平调整为 1,该基因在 K-Newman 中的相对表达水平如图所示($n=3,\bar{x}\pm s$),与在 Newman 中表达水平相比,a: $P<0.01$, b: $P<0.05$

图 2 RT-qPCR 检测金葡菌荚膜操纵子基因的表达水平

2.2 WalK(S221P)突变导致金葡菌荚膜合成增加

为探究 WalK(S221P)突变所致的荚膜合成基因表达上调是否引起金葡菌荚膜合成增加,采用荚膜染色试剂盒对 XN108 和 XN108-R 进行了染色观察,结果显示较多的金葡菌 XN108 菌体周围可见不易着色的较厚的透明状荚膜(图 3A),而少数 WalK(S221P)突变回复株 XN108-R 菌体外存在荚膜,且较薄(图 3B)。进一步透射电镜观察显示,XN108 菌株的细胞壁肽聚糖层外可见明显的絮状荚膜,较厚(图 3C),而回复株 XN108-R 菌体的肽聚糖层裸露,仅有散在的微量荚膜存在(图 3D)。上述结果均提示,WalK(S221P)突变具有促进金葡菌荚膜产生的作用。



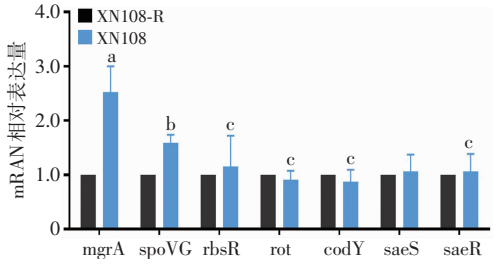
A:金葡菌 XN108 的荚膜染色,红色箭头显示荚膜;B:金葡菌 XN108-R 的荚膜染色;C:金葡菌 XN108 的透射电镜观察;D:金葡菌 XN108-R 的透射电镜观察

图 3 WalK(S221P)突变促进金葡菌的荚膜合成

2.3 WalK(S221P)突变通过间接途径促进金葡菌荚膜合成

WalKR 为金葡菌生长必需的二元调控系统,组氨酸蛋白激酶 WalK 接受外界信号刺激后可发生自磷酸化,而后将磷酸基团转移给效应分子 WalR,磷酸化激活的 WalR 再通过靶基因调控区的结合位点发挥功能[11,12]。我们在金葡菌荚膜合成操纵子 *capA* 基因上游 500bp 的调控区域内进行检索,未发现典型的效应分子 WalR 结合位点,提示 WalK(S221P)突变促进金葡菌荚膜合成可能是间接的。

文献表明,细菌转录因子 MgrA, SpoVG 和 RbsR 具有促进金葡菌荚膜合成的作用,而 Rot, CodY 和 SaeSR 则抑制金葡菌的荚膜合成[6,8]。采用 RT-qPCR 检测了上述转录因子在 XN108 和 XN108-R 中的表达差异,结果发现 *mgrA* 在 WalK(S221P)突变菌 XN108 中表达显著上调($P<0.001$),*spoVG* 也明显上调($P<0.05$),而其他转录因子的表达无明显差异(图 4),提示 WalK(S221P)突变促进金葡菌荚膜合成极有可能是通过调控 *mgrA* 表达来实现的。



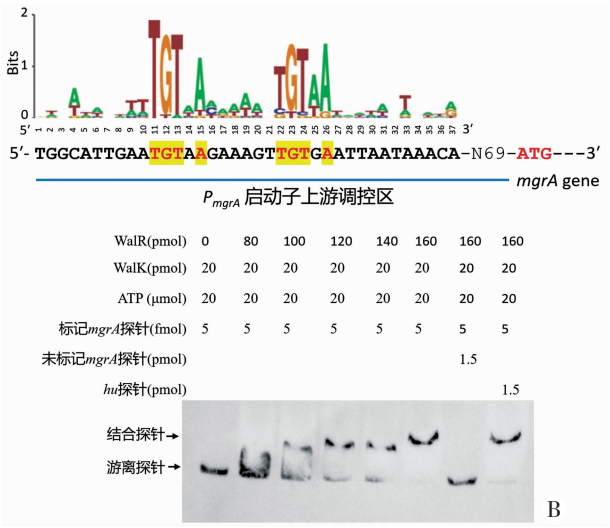
将目标基因与内参基因 *gyrB* 在回复株 XN108-R 中的平均相对表达水平调整为 1,该基因在 XN108 中的相对表达水平如图所示($n=3,\bar{x}\pm s$),与在 XN108-R 中表达水平相比,a: $P<0.001$, b: $P<0.05$, c: $P>0.05$

图 4 金葡菌荚膜合成调控因子的表达水平 RT-qPCR 检测

2.4 WalK(S221P)突变通过 MgrA 促进金葡菌荚膜合成

RT-qPCR 检测显示 WalK(S221P)突变导致 *mgrA* 基因表达上调,于是对 *mgrA* 基因上游调控区域进行检索,结果发现该区域存在典型的 WalKR 调控位点(图 5A),提示 WalKR 可能通过直接调控 *mgrA* 基因而影响金葡菌荚膜的产生。

为证实 WalKR 对 *mgrA* 基因的直接调控作用,我们合成了含有潜在结合位点的 *mgrA* 基因上游 DNA 探针(含预测的 WalKR 调控位点),利用重组蛋白 WalK 和 WalR 在体外进行 EMSA 实验。结果表明,一定量的重组蛋白 WalK(20 pmol)在体外激活不同剂量的效应分子 WalR(0~160 pmol)可结合标记的 *mgrA* 探针,且存在剂量依赖效应(图 5B),利用 300 倍剂量的无标记 *mgrA* 探针进行竞争,则活化的 WalR 结合标记探针的能力被显著抑制,而加入 300 倍剂量的无关 *hu* 探针则对特异性结合无明显抑制作用。这些结果表明,WalKR 对 *mgrA* 具有直接调控作用,WalK(S221P)突变促进金葡菌荚膜产生可通过上调 MgrA 的表达而实现。



A:金葡菌 *mgrA* 基因调控区 WalKR 调控位点预测;B:EMSA 实验

图 5 金葡菌 WalKR 对 *mgrA* 基因的直接调控作用

3 讨论

作为重要的机会致病菌,金葡菌可产生荚膜、溶血素、肠毒素、凝固酶、毒性休克综合征毒素等毒力因子参与致病[4,13]。其中,荚膜可帮助细菌抵抗吞噬细胞的吞噬和杀灭,促进金葡菌免疫逃逸[14]。金葡菌 XN108 为分离自一烧伤患者慢性感染的创口分泌物标本,既是一株 MRSA 菌(头孢西丁 MIC>256 μg/mL),

也是一株 VISA 菌(万古霉素 MIC = 12 μg/mL),携带 8 型荚膜合成基因簇[9]。本研究通过转录组和 RT-qPCR 检测发现万古霉素耐药性相关 WalK(S221P)突变可促进 XN108 荚膜基因表达显著上调;将该点突变引入到 5 型荚膜产生菌 Newman (MSSA 菌株)后,导致 K-Newman 的荚膜编码基因也表达上调,表明 WalK(S221P)突变可上调荚膜产生基因的表达水平,可能在金葡菌致病性中发挥作用。

荚膜的检测方法有多种,包括荚膜染色法、电镜观察、酶联免疫吸附法(ELISA)及荚膜定量分析法等[15-16]。其中 ELISA 法需要荚膜型特异性抗体,获取比较困难[15];荚膜定量分析法通常用苯酚-硫酸染色或质谱进行定量检测,需要定购多种糖标准品[16]。本研究首先采用荚膜染色法对 XN108 及突变回复菌株 XN108-R 的荚膜进行检测,可见携带 WalK(S221P)突变的 XN108 菌株荚膜产生能力明显强于回复株;进一步透射电镜观察也证实 XN108 产生的荚膜无论在数量,还是在厚度上都显著优于 XN108-R。这一荚膜产生能力的差异对菌株致病性的影响是我们接下来重点关注的工作。

金葡菌荚膜合成复杂而多样,*cap* 操纵子含有 16 个基因,可合成 11 种荚膜[16-17]。临床主要的 5 型荚膜和 8 型荚膜合成操纵子中除 *capH*, *capI*, *capJ* 和 *capK* 基因存在差异外,其余基因序列完全一致[17]。研究表明,多种转录因子可对金葡菌 *cap* 操纵子进行调控,形成复杂的调控网络[6, 8]。为探讨 WalK(S221P)突变促进金葡菌荚膜产生的机制,我们对 *cap* 操纵子的上游调控区进行了搜索,但未发现典型的 WalKR 调控位点,推测 WalK(S221P)突变对金葡菌荚膜产生的调控可能是间接的。于是,采用 RT-qPCR 检测了 7 种已知的金葡菌荚膜调控因子基因在 XN108 和 XN108-R 中的表达水平差异,结果发现金葡菌荚膜的正调控因子 MgrA 在 XN108 相较于回复株 XN108-R 中的表达差异最显著。进一步分析发现,*mgrA* 基因调控区存在典型的 WalKR 调控位点,利用 EMSA 实验也证实 WalK 激活的 WalR 能呈剂量依赖性地结合 *mgrA* 基因调控区 DNA 探针,表明 WalK(S221P)突变促进金葡菌荚膜产生主要是通过调控 MgrA 实现的。

综上所述,本研究率先发现 WalK(S221P)突变具有促进金葡菌荚膜产生的作用,进一步通过信息学检索分析、RT-qPCR 检测、EMSA 实验等阐明了 WalK(S221P)突变通过上调 MgrA 促进金葡菌荚膜产生的分子机制。这一作用机制的阐明不仅对深入理解金葡菌荚膜调控网络有现实意义,而且可为临床金葡菌感染的防控提供新的潜在靶标。

参考文献:

[1] LI L, KOIRALA B, HERNANDEZ Y, *et al*. Identification of structurally diverse menaquinone-binding antibiotics with *in vivo* activity against multidrug-resistant pathogens[J]. Nat Microbiol. 2022, 7(1): 120-131. DOI: 10.1038/s41564-021-01013-8.

[2] COHEN R, FINN T, BABUSHKIN F, *et al*. High rate of bacterial respiratory tract co-infections upon admission amongst moderate to severe COVID-19 patients[J]. Infect Dis (Lond). 2022, 54(2): 134-144. DOI: 10.1080/23744235.2021.1985732.

[3] 胡珍,尚伟龙,饶贤才. 基于 Antares2 的金黄色葡萄球菌生物发光示踪系统的构建[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(5): 393-399. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202212145.
HU Z, SHANG W, RAO X. Construction of *Staphylococcus aureus* bioluminescence tracing system based on Antares2[J]. J Army Med Univ, 2023, 45(5): 393-399. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202212145.

[4] DELEO FR, CHAMBERS HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era[J]. J Clin Invest. 2009, 119(9): 2464-2474. DOI: 10.1172/JCI38226.

[5] FOGEL L A, BUBECK WARDENBURG J. *Staphylococcus aureus* PSMs are a double-edged sword[J]. Nat Microbiol. 2022, 7(1): 12-13. DOI: 10.1038/s41564-021-01040-5.

[6] KEINHÖRSTER D, SALZER A, DUQUE-JARAMILLO A, *et al*. Revisiting the regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis gene cluster in *Staphylococcus aureus*[J]. Mol Microbiol. 2019, 112(4): 1083-1099. DOI: 10.1111/mmi.14347.

[7] MOHAMED N, TIMOFEYEVA Y, JAMROZY D, *et al*. Molecular epidemiology and expression of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States[J]. PLoS One. 2019, 14(1): e0208356. DOI: 10.1371/journal.pone.0208356.

[8] CROSBY HA, TIWARI N, KWIECINSKI JM, *et al*. The *Staphylococcus aureus* ArlRS two-component system regulates virulence factor expression through MgrA[J]. Mol Microbiol. 2020, 113(1): 103-122. DOI: 10.1111/mmi.14404.

[9] ZHANG X, HU Q, YUAN W, *et al*. First report of a sequence type 239 vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolate in Mainland China[J]. Diagn Microbiol Infec Dis. 2013, 77(1): 64-68. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.

2013.06.008.

[10] RAO Y, PENG H, SHANG W, *et al*. A vancomycin resistance-associated WalK(S221P) mutation attenuates the virulence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* [J]. J Adv Res. 2022, 40:167-178. DOI:10.1016/j.jare.2021.11.015.

[11] WU S, ZHANG J, PENG Q, *et al*. The role of *Staphylococcus aureus* YycFG in gene regulation, biofilm organization and drug resistance[J]. Antibiotics (Basel). 2021, 10(12): 1555. DOI:10.3390/antibiotics10121555.

[12] DUBRAC S, BISICCHIA P, DEVINE KM, *et al*. A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway[J]. Mol Microbiol. 2008, 70(6): 1307-1322. DOI:10.1111/j.1365-2958.2008.06483.x.

[13] NGUYEN TH, CHEUNG GYC, RIGBY KM, *et al*. Rapid pathogen-specific recruitment of immune effector cells in the skin by secreted toxins[J]. Nat Microbiol. 2022,7(1):62-72. DOI:10.1038/s41564-021-01012-9.

[14] BEHERA A, RAI D, KULKARNI SS. Total syntheses of conjugation-ready trisaccharide repeating units of *Pseudomonas aeruginosa* O11 and *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide for vaccine development[J]. J Am Chem Soc. 2020, 142(1):456-467. DOI:10.1021/jacs.9b11309.

[15] AHMADI K, ASLANI MM, POULADFAR G, F*et al*. Preparation and preclinical evaluation of two novel *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide 5 and 8-fusion protein (Hla-MntC-SACOL0723) immunoconjugates[J]. IUBMB Life. 2020, 72(2):226-236. DOI: 10.1002/iub.2159.

[16] LIU B, PARK S, THOMPSON CD, *et al*. Antibodies to *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides 5 and 8 perform similarly in vitro but are functionally distinct in vivo [J]. 2017, 8(6), 859-874. DOI:10.1080/21505594.2016.1270494.

[17] VISANSIRIKUL S, KOLODZIEJ SA, DEMCHENKO AV. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides: a structural and synthetic perspective[J]. Org Biomol Chem. 2020, 18(5):783-798. DOI: 10.1039/c9ob02546d.

(**收稿**:2023-09-20;**修回**:2023-10-17)

(编辑 邓强庭)