基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003603

GraSR通过MurC促进金黄色葡萄球菌中等耐受万古霉素的作用研究

张柳英[1]，李映红[1]，简福霞[1]，彭华刚[2]
（1.陆军特色医学中心重症医学科，重庆 400042；
2.陆军军医大学/第三军医大学基础医学院微生物学教研室，重庆 400038）

【摘 要】目的：探讨GraS（T136I）突变对万古霉素中等耐受金黄色葡萄球菌（vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*，VISA）耐药性的影响及机制。**方法：**采用同源重组技术将XN108（VISA）的GraS（T136I）突变位点引入到Newman（VSSA）构建突变菌株Newman-GraS（T136I），利用相同的方法在XN108中将突变位点进行回复，构建回复菌株XN108-GraS（I136T），利用E-test法测定各菌株对万古霉素的耐药性，通过透射电子显微镜观察各菌株细胞壁厚度，采用RT-qPCR检测了金葡菌细胞壁肽聚糖合成相关基因在XN108及其突变回复菌株XN108-GraS（I136T）中的表达水平变化，通过LacZ报告系统检测XN108和XN108-GraS（I136T）中*murC*基因启动子活性，通过结合位点分析和凝胶迁移阻滞实验（electrophoretic mobility shift assay，EMSA）证实GraSR对*murC*基因的调控作用。**结果：**Newman-GraS（T136I）和XN108-GraS（I136T）替换菌株构建成功。回复株XN108-GraS（I136T）对万古霉素的MIC从原来的12 μg/mL下降到8 μg/mL，突变菌株Newman-GraS（T136I）对万古霉素的MIC从野生株的1.5 μg/mL上升到4 μg/mL。透射电子显微镜结果显示，XN108-GraS（I136T）的细胞壁（20.097 ± 2.862）nm较野生株XN108（40.283 ± 3.784）nm明显变薄（*P*=0.000）。通过RT-qPCR实验发现，金葡菌细胞壁肽聚糖合成相关基因*murC*、*murD*和*mraY*在回复菌株XN108-GraS（I136T）中表达下调（*P*=0.000），且*murC*的下降水平最多（约1.935倍），LacZ活性检测分析显示XN108中*murC*基因的启动子活性（2 182.333 ± 104.580）明显强于其在XN108-GraS（I136T）（1 593.333 ± 179.258）中的活性（*P*=0.008），结合位点检索分析及EMSA实验证实GraS激活的GraR具有直接结合*murC*基因调控区的功能。**结论：**金葡菌GraS（T136I）突变具有促进VISA的形成的作用，该作用可能是通过上调细胞壁合成关键基因*murC*的表达，导致细胞壁增厚来实现的。

【关键词】金黄色葡萄球菌；万古霉素；耐药性；GraSR；细胞壁
【中图分类号】R378.1 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2023-10-18

Role of GraSR in promoting vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* through MurC

Zhang Liuying[1]，*Li Yinghong*[1]，*Jian Fuxia*[1]，*Peng Huagang*[2]
（*1. Department of Critical Care Medicine，PLA Army Characteristic Medical Center；2. Department of Microbiology，College of Basic Medical Sciences，Army Medical University / Third Military Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the influence of GraS（T136I）mutation on vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*（VISA）and its mechanism. ***Methods*：**The homologous recombination technique was used to introduce the GraS（T136I）mutation site of XN108（VISA）into Newman（VSSA）to construct the mutant strain of Newman-GraS（T136I），and the same method was used to reverse the mutation in XN108 to construct the reverse strain XN108-GraS（I136T）. The E-test stripes were used to measure the resistance of each strain to vancomycin；a transmission electron microscope was used to observe the cell wall thickness of each strain；RT-qPCR was used to measure the changes in the expression levels of peptidoglycan synthesis-related genes on the cell wall of *Staphylococcus aureus* in XN108 and its reverse mutant strain XN108-GraS（I136T）；the LacZ report system was used to measure *murC* gene promoter activity；binding site analysis and electrophoretic mobility shift assay（EMSA）were used to confirm the regulatory effect of GraSR on the *murC* gene. ***Results*：**The allelic replacement strains of Newman-GraS（T136I）and XN108-GraS（I136T）were constructed successfully. The minimal inhibitory con-

作者介绍：张柳英，Email：578681641@qq.com，
研究方向：重症医学科的护理和质量控制。
通信作者：彭华刚，Email：huagangpeng@126.com。
基金项目：重庆市自然科学基金资助项目（编号：CSTB2022NSCQ-MSX1330）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241023.0948.022（2024-10-23）

centration（MIC）of the reverse strain XN108-GraS（I136T）to vancomycin decreased from 12 μg/mL to 8 μg/mL，and the MIC of the mutant strain Newman-GraS（T136I）to vancomycin increased from 1.5 μg/mL in wild strain to 4 μg/mL. The transmission electron microscope showed that XN108-GraS（I136T）had a significantly thinner cell wall than the wild strain XN108［（20.097 ± 2.862）nm vs.（40.283 ± 3.784）nm，*P*=0.000］. RT-qPCR showed that the peptidoglycan synthesis-related genes *murC*，*murD*，and *mraY* on the cell wall of *Staphylococcus aureus* were significantly downregulated in the reverse strain XN108-GraS（I136T）（*P*=0.000），with the greatest reduction in *murC*（about 1.935 times）. The LacZ activity test showed that the promoter activity of the *murC* gene in XN108 was significantly higher than that in XN108-GraS（I136T）（2 182.333 ± 104.580 vs. 1 593.333 ± 179.258，*P*=0.008），and the binding site analysis and EMSA confirmed that GraR activated by GraS could directly bind to the control region of the *murC* gene. ***Conclusion***：GraS（T136I）mutation in *Staphylococcus aureus* can promote the formation of VISA，possibly by upregulating the expression of the key *murC* gene in cell wall synthesis and leading to cell wall thickening.

【Key words】*Staphylococcus aureus*；vancomycin；resistance；GraSR；cell wall

金黄色葡萄球菌是一种机会致病菌，在人体可引起多种疾病，从轻度皮肤感染到危及生命的疾病，如毒休克综合征、败血症、心内膜炎和坏死性肺炎等[1]。近年来，由于细菌的不断进化和抗生素的广泛使用，金葡菌的耐药性问题日益严峻，全球范围内耐甲氧西林金葡菌（methicillin-resistant *S. aureus*，MRSA）感染率逐年上升，使得临床上MRSA感染的治疗举步维艰。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%，位列临床分离菌种第3位，革兰阳性菌分离率第1位（http://www.chinets.com/Document）。万古霉素等糖肽类抗生素是临床治疗金葡菌感染的最后防线[2]。近年来，随着万古霉素使用的不断增加，万古霉素耐药性金葡菌不断出现，使金葡菌感染治疗面临无药可用的尴尬境地。万古霉素耐药金葡菌有3种类型：万古霉素完全耐药金葡菌（vancomycin-resistant *S. aureus*，VRSA，MIC≥16 μg/mL）、万古霉素中等耐药金葡菌（vancomycin-intermediate *S. aureus*，VISA，MIC=4~8 μg/mL）和异质性万古霉素中等耐药金葡菌（heterologous VISA，hVISA，MIC=2~4 μg/mL）[3]。自1997年从日本分离报道第1株VISA菌Mu50（万古霉素MIC=8 μg/mL）以来，在美国、中国、印度等地不断有VISA分离报道[4]。VISA的出现和流行已成为临床万古霉素治疗失败的重要原因，2017年，世界卫生组织（World Health Organization，WHO）将VISA列为12种亟需开发新型抗菌策略的高度优先级“超级细菌”之一。因此，控制VISA的感染和流行已成为全球关注的公共卫生问题。

目前，VISA的形成机制仍不完全清楚，但胞壁增厚是VISA菌株的一个普遍特征[5]。通过VISA与其同源敏感的金葡菌全基因组序列进行比对，发现众多基因的突变与VISA的形成密切相关，其中报道最多的是金葡菌二元调控系统组分编码基因，如*graSR*、*walKR*、*vraSR*等[6-8]。本课题组前期从临床分离鉴定出1株为ST239型VISA菌株XN108，该菌株对万古霉素的MIC=12 μg/mL，全基因组测序发现该菌存在WalK（S221P）和GraS（T136I）2个基因点突变，共同介导XN108的万古霉素耐药性[9-11]。WalK（S221P）介导万古霉素耐药性的功能已经被证实[10]，GraS（T136I）突变的作用及其调控VISA耐药性的机制仍不完全清楚。

本研究拟利用同源重组的方法构建XN108-GraS（I136T）与Newman-GraS（T136I）菌株，通过E-test法和透射电镜观察证实GraS（T136I）突变可导致万古霉素敏感度下降及细胞壁的增厚。进一步通过RT-qPCR检测细胞壁合成相关基因的表达，发现*murC*在XN108-GraS（I136T）表达显著降低，提示GraSR可能通过MurC促进金葡菌对万古霉素耐药性。最后，利用LacZ报告系统、结合位点检索分析及EMSA实验证实GraSR对*murC*的调控作用，阐明GraS（T136I）突变通过MurC促进VISA耐药性的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株及质粒 VISA菌株XN108由本实验室分离鉴定并保存，VSSA菌株Newman由吉林大学于录教授惠。pBT2和pOS1为大肠杆菌-金葡菌穿梭质粒，均由中国科技大学孙宝林教授惠赠。

1.1.2 主要仪器与试剂 WGP-400型电热恒温培养箱（上

海智城分析仪器制造有限公司），Gene Pulser XcellTM 型电穿孔仪（美国 Bio-Rad 公司），凝胶扫描成像仪（美国 Bio-Rad 公司），PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司），PrimeSTAR Max 聚合酶（宝生物工程有限公司），限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶（Thermo Scientific 公司），SV Total RNA Isolation System 试剂盒（Promega 公司），RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒（Thermo Scientific 公司），胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）、脑心浸液培养基（BHI）、胰蛋白胨和酵母提取物（英国 Oxoid 公司），万古霉素 E-test 试纸条（法国梅里埃公司）。

1.2 *方法*

1.2.1 突变菌株的构建 根据 XN108 和 Newman 基因组序列设计如下引物，引物序列如表 1 所示。利用设计的引物对 pBT2-GraSR-5 和 pBT2-GraSR-3，以 XN108 的基因组为模板，扩增含有 GraS（T136I）突变位点的片段，将片段经酶切后克隆到穿梭载体 pBT2 上，构建替换质粒 pBT2-GraS（T136I），将质粒电转化至金葡菌 RN4220 感受态细胞进行限制修饰，进一步将质粒电转化至 Newman 感受态细胞。根据 pBT2 温敏质粒特性筛选替换菌株，最后将成功引入突变的菌株命名为 Newman-GraS（T136I）。利用同样的方法构建 XN108-GraS（I136T）。利用引物对 GraS-check-5 和 GraS-check-3 扩增 GraS 基因，对突变位点进行测序鉴定。

表 1 PCR 引物设计

引物	序列（5'→3'）
GraS-check-5	ATGAATAATTTGAAATGGGTAGCT
GraS-check-3	TTAAAATGACAAATTTGTCACTTCC
pBT2-GraSR-5	CGGGGTACCATTGAGTGGAAGTTTAGTGAAAA
pBT2-GraSR-3	CCGCTGCAGGGTCATAATTAACGCCACCT
pBT2-5	CGACTGAGCCTTTCGTTTTA
pBT2-3	TCGATAGTGGCTCCAAGTAGC

1.2.2 E-test 实验 取 XN108、XN108-GraS（I136T）、Newman 与 Newman-GraS（T136I）的过夜培养菌液以 1∶100 比例接种于 TSB 培养基中，37 ℃培养 6 h，取培养物用 0.85% 无菌生理盐水稀释至 0.5 麦氏浓度，取 100 μL 稀释菌液涂布至 MHB 平板上，室温晾干，取万古霉素 E-test 试纸条贴于平板中央，将平板放置于 37 ℃培养箱中培养 24 h，根据试纸条读数判断 MIC 值。

1.2.3 细胞壁厚度测定 取 XN108、XN108-GraS（I136T）的过夜培养菌液以 1∶100 比例接种于 TSB 培养基中，37 ℃培养 6 h，取 500 μL 培养菌液离心去上清后，加入 2.5% 戊二醛固定液，并置于 4 ℃冰箱中固定过夜，将固定后的样品送至大学分析测试中心制备电镜切片，采用 TECNAI10 透射电子显微镜进行观察细菌的细胞壁，选取合适的视野进行摄像并测量细胞壁的厚度。

1.2.4 RT-qPCR 根据文献中介绍的细胞壁合成相关基因，以 XN108 基因组序列设计 RT-qPCR 引物，引物序列如表 2 所示，利用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒提取 XN108 与 XN108-GraS（I136T）总 RNA，加入 DNase I 去除污染的 DNA，利用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA，再采用 SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green 试剂进行 qPCR 检测靶基因的表达水平。每个样本设置 3 个生物学重复。

表 2 RT-qPCR 引物设计

引物	序列（5'→3'）
murA-RT-5	AAGGACGAAAATGCTGTTGTCGT
murA-RT-3	CTTCAAAACCTTTAATGTGTTGCTCA
murB-RT-5	ATTATCCGTGAAGGTGGTATTCGC
murB-RT-3	ATTGAACCTGGAATACCACATGCA
murC-RT-5	GCTGTAACTGGTGCACATGGTAAAAC
murC-RT-3	AAATAATCACTTTCAGGCAATCCCAT
murD-RT-5	ATCTATGGGTATTTCTGTTGTAAGTGGAA
murD-RT-3	GATTGGTGCTTCAGAGATTAGATAACTTAA
murE-RT-5	AATGTAGCTGATCAAGGGTGTAAGTTG
murE-RT-3	ACCATTTGTACCCGTTACACCAAAT
murF-RT-5	GACGGTCATCGCTTTGTCTCTAA
murF-RT-3	GTGACGGCAATTACTTTAGGGTTTA
murG-RT-5	AGGTTATGAAGCGCTTTATATTGGTTC
murG-RT-3	TTCAAAACTTTACGAGCATCAAGAATA
mraY-RT-5	GTCAAAGTATTCGAGAAGAAGGTCCA
mraY-RT-3	ATTAACCCAAAACCAATCGTCACA
femA-RT-5	AGGTAATGCTGGTAATGATTGGTTCT
femA-RT-3	GATTCTGACGTATCTTCCATAAATGATCT
gyrB-RT-5	AAATCGCCTGCGTTCTAGAG
gyrB-RT-3	CCAGGTAAATTAGCCGATTGC

1.2.5 报告系统 根据 XN108 的基因组序列设计如下引物，引物序列如表 3 所示，利用设计的引物对 pOS1-*murC*-5 和 pOS1-*murC*-3 扩增 *murC* 启动子片段将其克隆到建 pOS 载体上，构建报告质粒 pOS-*murC*，然后将报告质粒电转化至 RN4220 修饰后分别转化至 XN108 与 XN108-GraS（I136T），获得 LacZ 报告菌株。过夜培养菌株，取 200 μL 培养菌液于 96 孔板中测定细菌 600 nm 处的吸光度（absorbance，A）值，同时取 100 μL 菌液离心并重悬菌体，再加入 1 mg/mL 的溶葡萄球菌素，37 ℃裂解至澄清，加入 100 μL ONPG 显色液后，37 ℃反应至溶液开始变黄，并记录反应时间 T（min），最后加入 1 mL 1 M Na_2CO_3 终止反应，取 200 μL 反应液于 96 孔板中，利用分光光度计测定各样本的 A 值，根据公式 $U=1\,000\times A_{420\,nm}/(V\times T\times A_{600\,nm})$ 计算样本 LacZ 的单位酶活性。

表 3 扩增 *murC* 启动子片段引物设计

引物	序列（5'→3'）
pOS1-murC-5	CCGGAATTCTCAAGGTACATTTGTTTCTGATGACG
pOS1-murC-3	CGCGGATCCGGAAAATGATAGTGTGTCATTATAT AAAACTCCTT

1.2.6 结合位点分析 据文献报道，GraSR是金葡菌中与糖肽类抗生素耐药相关的二元调控系统，效应分子GraR通过与靶基因的识别基序直接结合发挥调控作用，其中GraR的识别基序（motif）为：5'-ACAAAWKTGT-3'。本课题组在金葡菌胞壁合成基因*murC*的调控区域内进行检索，分析可能的调控位点，为后续开展EMSA实验奠定基础。

1.2.7 EMSA实验 根据XN108基因组中*murC*的上游编码序列（含预测的GraSR调控位点）设计1对探针引物，其中上游引物用生物素进行标记，设计引物扩增*hu*基因的DNA片段作为非特异性竞争片段，引物序列见表4。利用引物对*murC*-5-biotin和*murC*-3扩增生物素标记的DNA探针，利用引物对*murC*-5和*murC*-3扩增相同的DNA作为竞争性探针，利用引物对*hu*-5和*hu*-3扩增*hu*基因作为非竞争性探针。取50 pmoL的DNA探针与实验室之前期制备的重组蛋白GraS激活不同剂量的重组蛋白GraR进行结合反应，同时加入25 μmoL ATP室温反应20 min，反应结束后，将样品进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、紫外交链，最后利用LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit试剂盒检测DNA探针迁移阻滞现象。

表4 EMSA实验的引物设计

引物	序列（5'→3'）
murC-5-biotin	GATGACGAAATTGATGATGTTGTTGA
murC-5	GATGACGAAATTGATGATGTTGTTGA
murC-3	CATTATATAAAACTCCTTACTCATAATTATTCTTTAT
hu-5	AAAAAGAAGCTGGTTCAGCAGTAG
hu-3	TTTACGTGCAGCACGTTCAC

1.3 统计学方法

所有统计分析均使用Graph-Pad Prism 9.0进行。符合正态分布的数据以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。组间比较采用独立样本t检验进行分析，多组间的比较使用单因素方差分析。检验水准α=0.05。

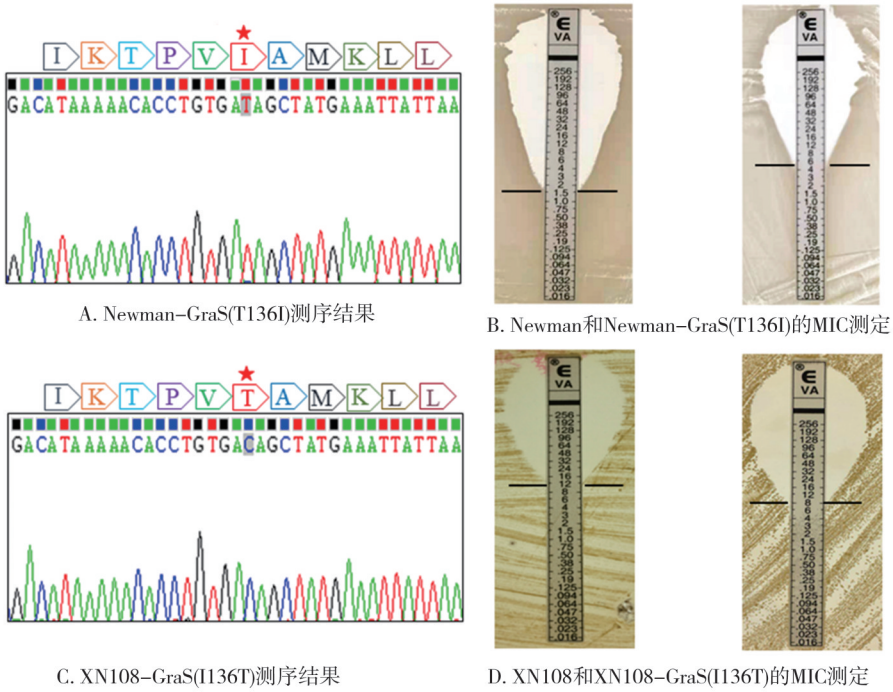
2 结 果

2.1 GraS（T136I）突变导致金葡菌对万古霉素的耐药性增加

为探索GraS（T136I）突变对金葡菌耐受万古霉素的影响。我们首先将XN108中的GraS（T136I）突变位点引入到VSSA菌株Newman中，经过测序鉴定突变菌株Newman-GraS（T136I）构建成功（图1A），E-test结果显示突变菌株Newman-GraS（T136I）对万古霉素的MIC从野生株的1.5 μg/mL上升到4 μg/mL（图1B）；进一步将XN108菌株GraS（T136I）点突变进行回复并测序鉴定，结果显示成功将XN108中的突变位点进行了回复（图1C），E-test结果显示回复株XN108-GraS（I136T）对万古霉素的MIC从原来的12 μg/mL下降到8 μg/mL（图1D），以上结果表明GraS（T136I）突变在XN108的耐药性中发挥重要功能，单独1个GraS（T136I）突变即可使万古霉素敏感菌Newman转变成VISA菌株。

2.2 GraS（T136I）突变导致金葡菌细胞壁增厚

细胞壁增厚是VISA具有的共同表型之一[5]。为了探索GraS（I136T）突变对是否通过改变金葡菌细胞壁厚度来增加细菌对万古霉素的敏感性，将XN108和突变回复菌株



A. Newman-GraS(T136I)测序结果

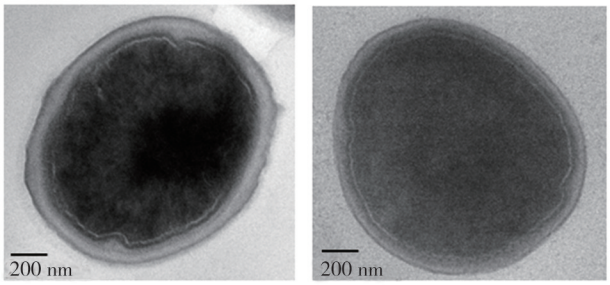
B. Newman和Newman-GraS(T136I)的MIC测定

C. XN108-GraS(I136T)测序结果

D. XN108和XN108-GraS(I136T)的MIC测定

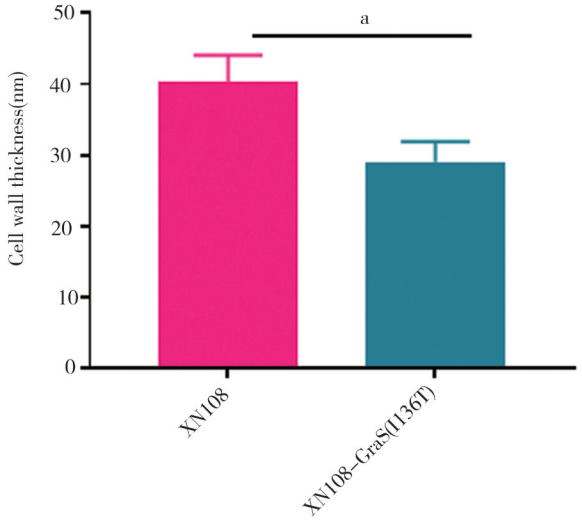
图1 测序鉴定Newman-GraS（T136I）及XN108-GraS（I136T）和E-test测序各菌株万古霉素耐药性

XN108-GraS(I136T)培养至对数生长期，取出培养物经过离心后加入2.5%戊二醛固定，制备切片后利用透射电镜观察XN108和突变回复菌株XN108-GraS(I136T)的细胞壁厚度，同时选取合适视野中的15个完整的细菌测定其细胞壁的厚度，并对所得数据进行统计分析，发现XN108-GraS(I136T)（20.097 ± 2.862 nm）的细胞壁较野生株XN108（40.283 ± 3.784 nm）显著变薄（t=7.468，P=0.000）（图2A、B）。



XN108　　XN108-GraS(I136T)

A. 透射电子显微镜拍照的结果（120 000×）



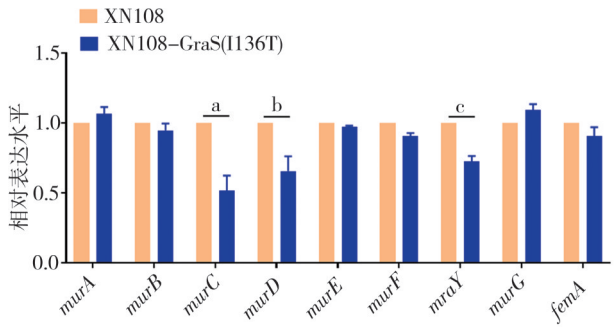
B. 细胞壁厚度比较

注：a，XN108-GraS(I136T)与XN108组细胞壁厚度比较，P=0.000

图2　透射电子显微镜观察XN108及XN108-GraS(I136T)的细胞壁厚度

2.3　GraS(T136I)突变上调肽聚糖合成相关基因的表达

细胞壁增厚和肽聚糖交联度下降是VISA的共同表型，金葡菌的细胞壁由肽聚糖和磷壁酸组成[5]。为进一步探索XN108发生GraS(T136I)突变可能通过某种细胞壁合成关键分子，调控金葡菌细胞壁合成厚度进而介导VISA耐药性。采用RT-qPCR检测了金葡菌细胞壁肽聚糖合成相关基因*murA*、*murB*、*murC*、*murD*、*murE*、*murF*、*mraY*、*murG*和*femA*在XN108及其突变回复菌株XN108-GraS(I136T)中的表达水平变化，结果显示*murC*，*murD*和*mraY*基因的表达水平在回复株中表达下调（$t_{(murC)}$=13.350，$P_{(murC)}$=0.000；$t_{(murD)}$=9.486，$P_{(murD)}$=0.000；$t_{(mraY)}$=7.644，P=0.000），且*murC*的下降水平最显著（约1.935倍），而其他基因差异无统计学意义（P>0.100）（图3）。



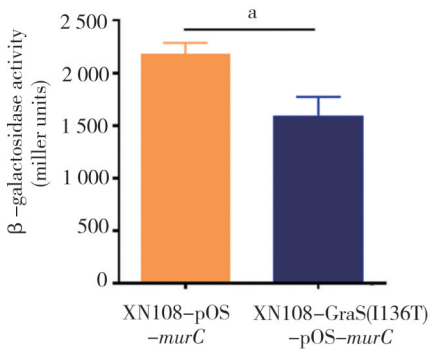
注：将目标基因相对于内参基因*gyrB*在XN108中的平均相对表达水平调整为1，该基因在XN108-GraS(I136T)中的相对表达水平如图所示（n=3，$\bar{x} \pm s$）；a，*murC*基因的表达水平比较，P=0.000；b，*murD*基因的表达水平比较，P=0.000；c，*mraY*基因的表达水平比较，P=0.000

图3　肽聚糖合成基因在XN108和回复株XN108-GraS(I136T)中表达差异

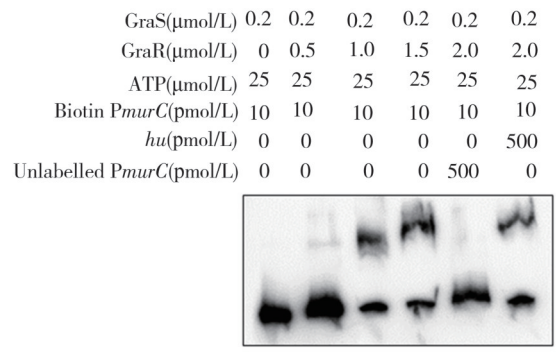
2.4　GraS(I136T)突变通过MurC促进金葡菌对万古霉素的耐药性

RT-qPCR检测显示*murC*、*murD*和*mraY*基因的表达水平在GraS(I136T)回复菌株中表达下调，且*murC*的下降水平最显著，MurC是金葡菌细胞壁肽聚糖合成途径中的关键酶之一，通过催化L-丙氨酸和UDP-MurNAc的交联而参与肽聚糖骨架与肽侧链合成起始。因此本课题组推测GraS(I136T)突变极可能通过直接调控*murC*基因来调节细胞壁肽聚糖的合成进而促进金葡菌对万古霉素的耐药性。

为了探究GraSR对*murC*基因具有调控作用，首先构建了*murC*启动子控制的LacZ报告质粒pOS-*murC*，并将其分别转化至XN108和XN108-GraS(I136T)菌株中，LacZ活性检测分析显示，XN108中*murC*基因的启动子活性（2 182.333 ± 104.580）明显强于其在XN108-GraS(I136T)中的活性（1 593.333 ± 179.258）（t=4.916，P=0.008）（图4A），表明GraSR对*murC*有调控功能。接着对*murC*基因上游调控区域进行生物信息学分析，发现在*murC*基因上游调控区域存在典型的GraSR结合位点（图4B），提示GraSR对*murC*有直接调控作用。为了证实这种直接调控作用，本课题组重组表达GraS和GraR蛋白，在ATP的作用下，使GraS磷酸化GraR，然后，扩增*murC*基因的启动子片段作为探针，利用凝胶迁移阻滞实验（electrophoretic mobility shift assay，EMSA）实验证明GraS磷酸化的GraR可以与*murC*启动子片段直接结合，且结合条带量随着GraR浓度升高而增加，而且加入50倍无关的DNA片段（*hu*）不影响其结合作用（图4C）。上述结果证明GraR可以直接调控*murC*的表达。



A. LacZ活性检测



C. EMSA实验

TCAAGGTACATTTGTTTCTGATGACGAAATTGATGATGTTGTTGATTTTATCAAACAACAAAGAGA
ACCGGACTATCTATTTGAAGAAAAAGAATTGTTGAAAAAA**ACACAAACACAATCA**CAAGATGAA
TTATTTGATGATGTTTGTGCATTTATGGTTAATGAAGGACATATTTCAACATCATTAATCCAAAGAC
ATTTCCAAATTGGCTATAATAGAGCAGCAAGAATTATCGATCAATTAGAGCAACTCGGTTATGTTT
CGAGTGCTAATGGTTCAAAACCAAGGGATGTTTATGTTACGGAAGCAGATTTAAATAAAGAATAA
TTATGAGTAAGGAGTTTTATATAATG**ATG**----*murC*

Predicted GraR binding site

B. GraR结合位点预测

注：a，报告质粒pOS-*murC*在XN108和XN108-GraS(I136T)中LacZ活性比较，P=0.000

图4 GraSR对MurC具有直接调控作用

3 讨 论

金黄色葡萄球菌是一种适应性强的病原体，可以适应各种复杂的环境，导致它在全球范围内广泛传播，造成重大死亡和发病率[12]。万古霉素是治疗金葡菌严 重感染的最后一道防线，然而随着万古霉素使用的增加，临床上逐渐出现VISA感染，现今VISA感染给人类的健康带来了重大威胁。为了面对VISA感染的严峻形势，世界卫生组织在2007年将VISA列为亟需开发新型控制策略的12种“超级细菌”之一。研究VISA产生的分子机制，对于开发新策略来控制VISA感染具有重要支撑作用。研究表明，VISA的形成与许多基因突变存在密切关系，而且，不同的突变位点对VISA菌株耐药性的贡献存在明显差异，在这些突变基因中仅有少数突变位点的功能经过实验验证[13]。因此，探索每个突变基因对VISA产生的贡献，对深入阐明特定的基因突变和VISA共有表型之间的关键调控通路具有重要指导意义。

本课题组前期分离并鉴定的1株VISA菌株，命名为XN108，通过采用逐步回复突变基因的方式证明WalK(S221P)和GraS(T136I)突变在XN108的VISA表型形成中发挥了关键作用，两者可协同介导XN108对万古霉素的耐药性[9-11]。其中，前期已经阐明WalK(S221P)突变介导XN108对万古霉素的耐药性的分子机制，然而GraS(T136I)突变介导XN108对万古霉素的耐药性的分子机制不清。细菌的二元调控系统在细菌的耐药性调节过程中发挥重要的作用，GraSR为金葡菌糖肽类相关的二元调控系统，其信号传递过程为：GraS感受外界刺激导致组氨酸发生磷酸化，通过磷酸转移将磷酸基团转移到GraR，使GraR磷酸化，磷酸化的GraR再去调控靶基因的表达，由此可见，GraS的磷酸化水平决定其激活GraR的水平，进而影响GraR调控下游靶基因的能力[14-15]。首先，本课题组采用基因替换的方法证明GraS(T136I)突变可使万古霉素敏感菌Newman转变成VISA菌株，并且可导致VISA共同表型细胞壁增厚。为深入探索GraS(T136I)与细胞壁增厚表型之间的联系，采用RT-qPCR检测了XN108和其回复菌株XN108-GraS(IT136T)中细胞壁代谢相关基因的表达水平变化。结果发现回复株XN108-GraS(I136T)与野生株相比，*murC*、*murD*和

*mraY*基因的表达水平显著降低，而其他基因无显著变化。最后为了阐明GraS（T136I）突变导致XN108细胞壁增厚的分子机制，对*murC*，*murD*和*mraY*基因启动子区进行了搜索，在*murD*和*mraY*基因启动子区未发现典型的GraSR调控位点，而在*murC*基因启动子区存在GraSR调控位点，故推测GraSR可以直接调控*murC*基因的表达。利用EMSA实验证实体外GraS激活的GraR能呈剂量依赖性结合*murC*基因调控区DNA探针，表明GraS（IT136T）突变介导XN108中等耐受万古霉素的机制是通过调控*murC*基因实现的。

综上所述，本研究结果表明金葡菌中GraS（T136I）突变可以介导VISA菌株形成，并初步证明T136I突变可能导致GraS激酶的自磷酸化能力增强，进而促进GraR的磷酸化和调控功能；活性升高的GraSR直接上调金葡菌细胞壁肽聚糖合成关键酶MurC的表达，促进金葡菌肽聚糖的合成，细胞壁增厚，最终导致金葡菌对万古霉素的耐药性升高。研究结果证实GraSR通过MurC介导金葡菌对万古霉素的中等耐药，为揭示VISA形成的分子机制奠定了基础，是后续开发新型VISA防治策略的重要前提。

参 考 文 献

[1] Turner NA，Sharma-Kuinkel BK，Maskarinec SA，et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*：an overview of basic and clinical research[J]. Nat Rev Microbiol，2019，17(4)：203-218.

[2] Sarkar P，De K，Modi M，et al. Next-generation membrane-active glycopeptide antibiotics that also inhibit bacterial cell division[J]. Chem Sci，2023，14(9)：2386-2398.

[3] Howden BP，Peleg AY，Stinear TP. The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*（VISA）and heterogenous-VISA[J]. Infect Genet Evol，2014，21：575-582.

[4] Hu QW，Peng HG，Rao XC. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*[J]. Front Microbiol，2016，7：1601.

[5] Cui LZ，Ma XX，Sato K，et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Microbiol，2003，41(1)：5-14.

[6] Howden BP，McEvoy CRE，Allen DL，et al. Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR[J]. PLoS Pathog，2011，7(11)：e1002359.

[7] Cui LZ，Neoh HM，Shoji M，et al. Contribution of vraSR and graSR point mutations to vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother，2009，53(3)：1231-1234.

[8] Neoh HM，Cui LZ，Yuzawa H，et al. Mutated response regulator graR is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother，2008，52(1)：45-53.

[9] Peng HG，Rao YF，Yuan WC，et al. Reconstruction of the vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* phenotype from a vancomycin-intermediate *S. aureus* XN108[J]. Front Microbiol，2018，9：2955.

[10] Peng HG，Hu QW，Shang WL，et al. WalK（S221P），a naturally occurring mutation，confers vancomycin resistance in VISA strain XN_{108}[J]. J Antimicrob Chemother，2017，72(4)：1006-1013.

[11] Rao YF，Peng HG，Shang WL，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.

[12] Howden BP，Giulieri SG，Wong Fok Lung T，et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation[J]. Nat Rev Microbiol，2023，21(6)：380-395.

[13] Gardete S，Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Invest，2014，124(7)：2836-2840.

[14] Fridman M，Williams GD，Muzamal U，et al. Two unique phosphorylation-driven signaling pathways crosstalk in *Staphylococcus aureus* to modulate the cell-wall charge：Stk1/Stp1 meets GraSR[J]. Biochemistry，2013，52(45)：7975-7986.

[15] Falord M，Mäder U，Hiron A，et al. Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraSR regulon reveals novel links to virulence，stress response and cell wall signal transduction pathways[J]. PLoS One，2011，6(7)：e21323.

（责任编辑：李青颖）