

研究报告

血浆凝集降低筛选金黄色葡萄球菌促凝相关基因

罗东¹ 姜北² 李培群¹ 董霞¹ 林时荣¹ 胡晓梅^{2*} 陈开森^{1*}

(1. 南昌大学第一附属医院检验科 江西 南昌 330006)

(2. 第三军医大学微生物学教研室 重庆 400038)

摘要:【背景】金黄色葡萄球菌是重要的致病菌，其中促凝聚是重要的致病机制之一，可能存在新的基因参与其中。【目的】通过采用血浆凝集降低方法筛选及鉴定促凝相关基因。【方法】利用转座子随机插入突变技术建立金黄色葡萄球菌转座子突变文库，采用动态比浊及试管凝集技术筛选凝集能力降低的突变株；应用抗性标记挽救法鉴定突变基因并应用生物信息学预测基因的功能。【结果】通过观察血浆凝集能力降低共计筛选到突变菌株 82 个。鉴定其中的 76 个突变菌株的转座子插入位点，涉及基因 13 个，包括报道的与促凝集有关基因 4 个(占筛选基因的 30.8%)。【结论】从金黄色葡萄球菌凝集能力降低筛选与促凝集可能有关的基因，为金黄色葡萄球菌促凝集基因的筛选提供了新策略，同时为了解该菌促凝集过程提供了候选基因。

关键词: 金黄色葡萄球菌, Tn917, 凝集降低, 促凝基因

A novel method of screening procoagulant genes from decreased agglutination phenotype in *Staphylococcus aureus*

LUO Dong¹ JIANG Bei² LI Pei-Qun¹ DONG Xia¹ LIN Shi-Rong¹
HU Xiao-Mei^{2*} CHEN Kai-Sen^{1*}

(1. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

(2. Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: [Background] *Staphylococcus aureus* is an important pathogen, and procoagulation is one of the most important pathogenic mechanism, possibly novel genes in this approach. [Objective] To screen and identify procoagulant genes of *Staphylococcus aureus* by observing the decreased agglutination of colony phenotype. [Methods] Random mutagenesis library was constructed by using Tn917 transposon system, and mutants would be screened by combining dynamic turbidimetry and tube agglutination. The related genes were identified, and putative function of these genes was

Foundation item: Key Research Fund of Jiangxi Education Department (GJJ160025)

*Corresponding authors: HU Xiao-Mei; E-mail: hxmay2008@163.com

CHEN Kai-Sen; Tel: 86-791-88692594; E-mail: chenks100@126.com

Received: May 04, 2017; **Accepted:** August 07, 2017

基金项目: 江西省教育厅重点项目(GJJ160025)

*通信作者: 胡晓梅; E-mail: hxmay2008@163.com

陈开森; Tel: 86-791-88692594; E-mail: chenks100@126.com

收稿日期: 2017-05-04; 接受日期: 2017-08-07

predicted through bioinformatics analysis. **[Results]** A total of 82 mutants were selected in a way of decreased agglutination phenotypes, and insertion sites of 76 mutants were successfully identified with 13 mutated genes, including 4 were reported in previous studies (which is 30.8% of these genes identified). **[Conclusion]** We acquired related genes based on decreased agglutination of mutants, and this was a new method of identifying potential genes involved in procoagulant ability, at the same time, new agglutination candidates obtained were reserved for further study.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Tn917, Decreased aggregation, Procoagulant genes

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 简称金葡菌, 是临床上重要的致病菌, 可引起心内膜炎、脑膜炎、脓毒血症等重症感染, 也可导致创面、呼吸道及尿路等常见感染^[1-2]。金葡菌可产生多种致病物质, 如凝固酶、透明质酸酶、溶纤维蛋白酶、溶血素、肠毒素等多种毒性蛋白质。这些物质有利于细菌逃避机体固有免疫应答, 如补体抑制、吞噬细胞趋化、活化和杀菌作用抑制; 也可溶解中性粒细胞、中和防御素和抑制调理作用等^[3-4]。

分泌促凝因子导致血液或血浆凝集是金葡菌重要的致病机制, 其作用是通过机械性屏障隔断免疫细胞和细菌间的接触, 从而导致菌体杀伤受抑制, 有利于形成脓肿及菌体被包裹而出现远处转移等现象。目前公认的参与促凝集有关的基因包括 *Coa*、*VWbp* 和 *CifA*^[5-7], 但研究证实这些基因的有效清除并不能完全抑制脓肿的形成, 而脓肿形成的重要条件之一是局部血液或血浆出现凝集, 提示还存在其它基因参与到金葡菌的凝集过程中^[8]。例如, Walker 等的研究表明 *ebh* 基因编码的金葡菌表面大蛋白(Giant staphylococcal surface protein, GSSP)对凝聚起抑制作用^[9]。最近的研究也证实, 细菌细胞壁增厚可影响金葡菌促血浆凝集能力, 可能的原因是细胞壁增厚、血浆凝固酶分泌受限^[10]。虽然 *Agr*、*SarA*、*ArIRS* 和 *SaeRS*^[11-13]等全局性调控因子对血浆凝固酶的分泌具有重要影响, 但相互间作用如何及是否还有其它调控因子参与目前并没有详细的数据。虽然国际上金葡菌致病机理仍然是研究热点, 但对该菌的促血(液)浆凝集的具体机制仍然不清楚, 因此有必要进行深入研究。

筛选金葡菌促凝因子及对应基因的方法有定

向突变、基因敲除、转录组及蛋白谱分析等。转座子突变技术利用转座子插入染色体, 并导致插入位点基因失活的特性为研究基因功能较好的方法。转座子 Tn917 常用于构建革兰氏阳性菌突变文库, 包括葡萄球菌、肠球菌和革兰氏阳性杆菌等^[14]。当在高温及红霉素诱导下该转座子可发生转座反应, 从而构建随机突变文库, 并在全基因组水平上筛选与促凝集有关基因成为可能^[15]。

本研究采用 Tn917 转座子建立了金葡菌随机插入突变文库, 通过凝集能力降低筛选并鉴定了 13 个凝集能力降低的不同基因, 其中已有报道与凝集增加有关基因 4 个, 占总筛查基因的 30.8%。本研究为深入了解金葡菌促凝集相关基因提供了思路, 为该菌的致病基因研究提供了候选基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

金葡菌 Newman 株由第三军医大学胡晓梅教授惠赠, 金葡菌 RN4220 及转座子 Tn917 质粒 pID408 由上海仁济医院李敏惠赠, 大肠埃希菌 DH5 α 感受态购于北京天根生物技术有限公司, 大肠埃希菌 DH5 α 由本实验室保存。

1.1.2 主要仪器和试剂

聚合酶链反应(PCR)仪、动态比浊仪及电转仪, Bio-Rad 公司; 紫外凝集成像仪, 北京六一公司。PCR Master Mix, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取纯化试剂盒及红霉素、氯霉素及氨苄青霉素, 北京天根生物技术有限公司; BHI 培养基, Oxiod 公司; 溶葡萄球菌素, 江苏碧云天生物有限公司; 限制性核酸内切

酶及 T4 DNA 连接酶, 大连宝生物有限公司; 血平板及 MH 平板, 上海科玛嘉公司; 混合血浆, 本院健康体检者。

1.2 方法

1.2.1 金葡菌 RN4220 和 Newman 株的培养

金葡菌 RN4220 和 Newman 株划线接种于 5% 羊血平板上, 35 °C 培养 16–18 h, 挑取单个菌落(RN4220/Newman)接种于 100 mL BHI 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 1 h 至 OD_{600} 值约 0.4, 4 °C、10 000×g 离心 5 min 收集对数生长期细菌, 待用。

1.2.2 Newman 随机突变文库的建立

将菌液 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 以 0.5 mol/L 蔗糖溶液轻柔重悬、洗涤, 重复 3 次, 最终以 500 μ L 0.5 mol/L 蔗糖溶液重悬, 制备金葡菌感受态。提取 MH 培养基上生长的含有质粒 pID408 的大肠埃希菌 DH5 α 的质粒 pID408, 经过 RN4220 修饰后电转入 Newman 株中, 电转条件为: 0.4 cm 电转杯, 2.5 kV, 200 Q, 25 μ F。电转体系为质粒 10 μ L+90 μ L (金葡菌 RN4220 或 Newman 株)。电转完成后将菌液涂布于 ERY+CHL 双抗平板上, 30 °C 培养过夜。收集平板上的菌落到 100 mL BHI 中, 摇匀则制备成突变文库。

1.2.3 金葡菌随机突变文库的建立

参照姜北等^[15], 具体过程如下: 将含有噬菌体 Tn917 的 pID408 质粒在大肠埃希菌 DH5 α 中进行增殖培养, 收集高浓度质粒电转入 RN4220 进行修饰, 随后将修饰的质粒电转入金葡菌 Newman 中, 然后高温+红霉素诱导 Tn917 转座, 最后将转座后菌液接种于红霉素平板上进行培养, 收集菌落则获得转座子文库。

1.2.4 血浆凝集能力降低克隆菌株的筛选

挑取血平板上克隆划线接种到 MH 平板上增菌, 随后制备菌液浓度为 2.0 麦氏单位。取健康体检者无黄疸混合血浆 150 μ L 及上述菌液 50 μ L 到微量反应孔中, 混匀后 340 nm 下动态比浊测定吸光度值的变化^[16]。此外, 吸取混合血浆 1.5 mL 到小

试管中, 加入 0.5 mL 上述菌液, 混合后反应过夜, 观察时间点为 1、2、3、6 及 18 h。动态比浊及试管凝集同时表明突变克隆的凝集能力降低则鉴定突变基因, 若两者不一致则重复测定, 结果一致才纳入突变基因的鉴定中。

1.2.5 突变基因的鉴定

通过抗性标志检测法确认转座子插入位点。首先提取突变菌株基因组 DNA, 再用 *EcoR* I 酶对基因组进行单酶切, 酶切产物使用 T4 DNA 连接酶自连, 形成无数个自连片段。由于金葡菌中含有数千个 *EcoR* I 酶切位点, Tn917 转座子含有一个 *EcoR* I 酶切位点, 形成目的片段将含有来源于金葡菌基因序列及来源于转座子的抗性基因以及自我复制起点。将所有自连片段化学法转入大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞, 利用 AMP 抗性筛选得到含有转座子自连片段质粒, 抽取质粒, 利用距 Tn917 近红霉素抗性基因端(Em-proximal) 77 bp 处的反向重复区域设计测序引物 (5'-AGAGAGATGTCACCGTCAAGT-3') 进行测序, 完成测序后将序列与 Newman 标准株基因组进行比对即可获得转座子插入的位点, 从而确认突变的基因。

1.2.6 生物信息学分析

测序所得到的插入位点序列通过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 局部相似查询, 分析、预测基因的可能功能。

2 结果与分析

2.1 突变文库的建立及血浆凝集能力降低克隆的筛选

利用 Tn917 转座子对 Newman 标准株随机突变构建了突变文库, 随后联合采用动态比浊技术及试管凝集技术筛选凝集能力消失或降低的克隆株, 共计鉴别了 1 000 个克隆株, 发现 82 株表现为凝集能力降低或消失(图 1、2)。

2.2 突变基因的鉴定

为确定各突变菌株中转座子所插入的失活基

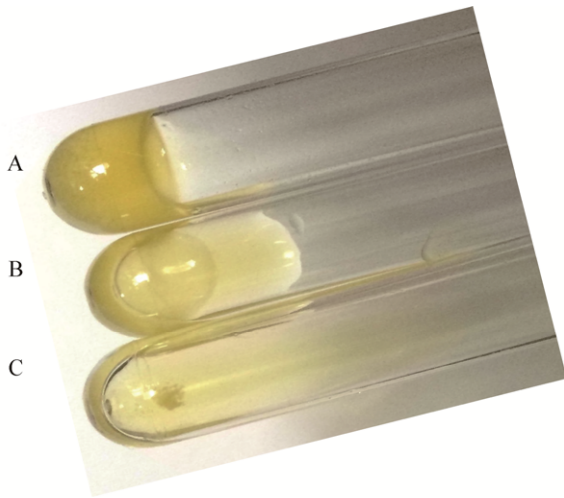


图1 凝集能力降低或无凝集能力图

Figure 1 Map of reduced or non agglutinating ability

注: A: 完全凝聚; B: 凝聚减弱; C: 不凝聚.

Note: A: Complete agglutination; B: Decreased agglutination; C: No agglutination.

因, 抗性挽救标记法对各转座子插入位点进行鉴定, 测序得到金葡菌插入位点下游的核苷酸序列。通过与Newman标准株全基因组序列比对分析确认转座子在金葡菌基因组中的插入位点, 分析获得相应的插入突变的预测基因编号, 82株菌进行了插入位点的鉴别, 鉴定出76株凝集能力降低或消失的

突变株。6株未鉴定出菌株, 可能由于DNA模板提取质量不合格或插入位点附近酶切片段过长导致质粒形成过大而不易转化等原因导致。

2.3 基因生物信息学分析

为了解插入突变基因的信息, 根据插入突变位点和Newman测序基因在NCBI中的注释, 将鉴定出的突变基因及其可能的功能进行了比较分析。在鉴定出的76个突变菌株中共涉及13个预测的功能基因(表1)。其中19株突变转座子都插在预测基因NWMN_0674上; 19株突变转座子都插在预测基因NWMN_0952上; 7株突变转座子都插在预测基因NWMN_0166上; 5株突变转座子都插在预测基因NWMN_0756上; 3株突变转座子都插在预测基因NWMN_1345上; 3株突变转座子都插在预测基因NWMN_1282上; 1株突变转座子插在预测基因NWMN_1228上。此外, 16株突变转座子都插在预测基因NWMN_RS15340或NWMN_RS15335上; 2株突变转座子都插在预测基因NWMN_1276及NWMN_1277间; 1株突变转座子插在预测基因NWMN_RSO4585及NWMN_RSO4590上, 上述6个临近基因都可能受到影响。

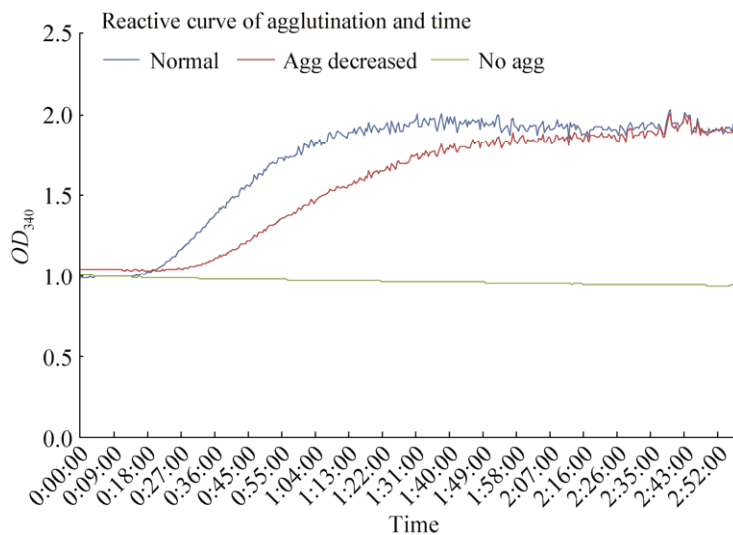


图2 凝集能力消失或降低的动态比浊曲线

Figure 2 Dynamic turbidimetric curve of no or decreased agglutination

注: Agg: 聚集.

Note: Agg: Agglutination.

表 1 筛选出的突变基因生物信息结果

Table 1 The biological information of the mutated genes

鉴定次数 Quantity	凝聚程度 Agglutinant ability	定位基因 Located gene	基因的功能 Predictive function
19	不凝集	NWMN_0674	SaeRS 系统
3	凝集减弱	NWMN_1345	高渗透压抗性蛋白 Ehb
5	不凝集	NWMN_0756	聚集因子 A
7	不凝集	NWMN_0166	凝固酶
19	不凝集	NWMN_0952	泛醌细胞色素还原酶亚单位 I
1	凝集减弱	NWMN_RSO4585 与 NWMN_RSO4590 间	铁硫簇装配附件蛋白 NADH 脱氢酶
3	凝集减弱	NWMN_1282	吡啶-3-甘油磷酸合酶
1	凝集减弱	NWMN_1228	苏氨酸醛缩酶
2	凝集减弱	NWMN_1276 与 NWMN_1277 间	DNA 修复蛋白 MucB 预苯酸脱氢酶
16	不凝集	NWMN_RS15340 与 NWMN_RS15535 间	功能未知蛋白与 IS5/IS1182 家族转座酶间

在鉴定的插入突变中, 预测与全局调控系统的突变株共计 19 株, 涉及 1 个基因; 外分泌蛋白共计 15 株, 涉及 3 个基因; 与能量代谢突变株 20 个, 涉及 2 个基因; 与生理代谢突变株 6 个, 涉及 3 个基因; 另外 16 个突变株位于未知功能蛋白及转座酶 IS5/IS1182 间, 具体功能不明。

3 讨论与结论

金葡菌由于分布广泛、致病力强及常导致临床患者感染而倍受关注, 其中皮肤粘膜及软组织的局部化脓性感染常由该菌导致。由于局部免疫力的受限及该菌分泌的粘性物质导致该菌被包裹从而避免了免疫细胞的有效杀伤, 该过程常由各种因子联合作用导致, 而促凝集相关蛋白在其中发挥了重要作用^[17]。目前已知的这些相关外分泌蛋白包括血浆凝固酶、ClfA 及 VWbp, 然而是否存在其它蛋白及该过程如何受到控制仍然尚不明确。

通过采用 Tn917 转座子建立的突变文库并观察血浆凝集能力降低的突变菌株, 我们共筛选到 13 个可能与促凝集有关的基因, 其中聚集因子 A 及血浆凝固酶基因为已知的促凝集基因^[5,7]。另外, NWMN_1345 编码的高渗透压抗性蛋白 Ehb 为近年来发现的另一个参与血浆凝集的蛋白, 该基因的敲

除将导致该菌的凝集能力降低^[9], 本研究的结果与其一致。虽然文献调查发现多种调控系统参与了凝集过程, 但部分调节因子为抑制凝集产生, 因此本研究采用的凝集能力降低菌株不适合这些基因的筛选而被漏检。SaeRS 双组分调节系统的相关基因被多次检出, 可能与其参与促凝有关。另外, 本研究还发现较多的新基因参与血浆凝集, 例如 NWMN_0952 编码的泛醌细胞色素还原酶主要参与物质代谢及能量传递, 但该基因的突变失活并没有影响到细菌的生长(生长曲线已确认), 因此该基因为重要的促凝集基因。除能量传递及代谢有关基因外, 我们还发现了多个未知功能的基因也参与到促凝集过程, 具体的过程需进一步研究。

令人遗憾的是, 本突变文库并没有筛选到所有已知参与血浆凝集的基因, 例如 Rot、MgrA 及 VWbp, 原因可能与我们建立的突变文库量较低或突变随机性不够或筛选克隆较少等有关。另一不可忽视的原因是血浆凝集受多种因素的影响, 例如 Cheng 等^[18]的研究表明 vWbp 单基因突变后金葡菌仍然能够使血浆凝集。总之, 本研究为致病基因的快速筛选提供了新方法, 为进一步阐明金葡菌致病机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Wu CH, Song QY, Li PQ, et al. The study of the drug resistance difference and treatment significance of *Staphylococcus aureus* in different departments[J]. Experimental and Laboratory Medicine, 2016, 34(4): 435-438 (in Chinese)
伍晨辉, 宋秋月, 李培群, 等. 不同科室分离金黄色葡萄球菌耐药差异及意义探讨[J]. 实验与检验医学, 2016, 34(4): 435-438
- [2] Huang YF, Chen KS, Yu Y, et al. Drug-resistant spectrum and trend of *Staphylococcus aureus* in a Nanchang certain tertiary hospital, 2008-2014[J]. Modern Preventive Medicine, 2016, 43(5): 948-950,957 (in Chinese)
黄艳芳, 陈开森, 余阳, 等. 2008-2014 年南昌某医院金黄色葡萄球菌耐药谱及变化趋势[J]. 现代预防医学, 2016, 43(5): 948-950,957
- [3] Utay NS, Roque A, Timmer JK, et al. MRSA infections in HIV-Infected people are associated with decreased MRSA-Specific Th1 immunity[J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(4): e1005580
- [4] Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, et al. Staphylococcal manipulation of host immune responses[J]. Nature Review Microbiology, 2015, 13(9): 529-543
- [5] Watanabe S, Ito T, Sasaki T, et al. Genetic diversity of staphylocoagulase genes (*coa*): insight into the evolution of variable chromosomal virulence factors in *Staphylococcus aureus*[J]. PLoS One, 2009, 4(5): e5714
- [6] Thomer L, Schneewind O, Missiakas D. Multiple ligands of von Willebrand factor-binding protein (vWbp) promote *Staphylococcus aureus* clot formation in human plasma[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(39): 28283-28292
- [7] McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, et al. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen[J]. European Journal of Biochemistry, 1997, 247(1): 416-424
- [8] Malachowa N, Kobayashi SD, Porter AR, et al. Contribution of *Staphylococcus aureus* coagulases and clumping factor A to abscess formation in a rabbit model of skin and soft tissue infection[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0158293
- [9] Walker JN, Crosby HA, Spaulding AR, et al. The *Staphylococcus aureus* ArlRS two-component system is a novel regulator of agglutination and pathogenesis[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(12): e1003819
- [10] Sirichoat A, Wongthong S, Kanyota R, et al. Phenotypic characteristics of vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus*[J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2016, 9(1): e26069
- [11] Xue T, You YB, Shang F, et al. Rot and Agr system modulate fibrinogen-binding ability mainly by regulating *clfB* expression in *Staphylococcus aureus* NCTC8325[J]. Medical Microbiology and Immunology, 2012, 201(1): 81-82
- [12] Fournier B, Klier A, Rapoport G. The two-component system ArlS-ArlR is a regular of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*[J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(1): 247-261
- [13] Mainiero M, Goerke C, Geiger T, et al. Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system saeRS[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(3): 613-623
- [14] Chen YH, Shi XM. Mutagenesis on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* by Tn917 transposon insertion[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(6): 952-954 (in Chinese)
陈永辉, 史贤明. 利用转座子 Tn917 构建单核细胞增生李斯特菌菌膜形成突变株[J]. 微生物学报, 2005, 45(6): 952-954
- [15] Jiang B, Li S, Zhang XP, et al. Construction of *Staphylococcus aureus* transposon library with transposon Tn917 and identification of mutants with altered persistence[J]. Journal of Third Military Medical University, 2014, 36(9): 923-927 (in Chinese)
姜北, 黎庶, 张骁鹏, 等. 金黄色葡萄球菌转座文库构建与持留突变株研究[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(9): 923-927
- [16] Liu T, Huang YF, Wu CH, et al. Exploration of the kinetic turbidimetric assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus*[J]. Experimental and Laboratory Medicine, 2015, 33(6): 708-710,741 (in Chinese)
刘涛, 黄艳芳, 伍晨辉, 等. 动态比浊快速鉴定金黄色葡萄球菌方法建立及应用评价[J]. 实验与检验医学, 2015, 33(6): 708-710,741
- [17] Kwiecinski J, Jin T, Josefsson E. Surface proteins of *Staphylococcus aureus* play an important role in experimental skin infection[J]. Automated Project Management Information System, 2014, 122(12): 1240-1250
- [18] Cheng AG, McAdow M, Kim HK, et al. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity[J]. PLoS Pathogens, 2010, 6(8): e1001036