



研究报告

乳源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *icaA/D* 基因缺失株的构建及其生物被膜形成能力与耐药性分析韩雨希^Δ 张婷婷^Δ 吕丽丽 李瑾年^{*}

安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036

摘要:【背景】耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是一种具有多重耐药性的人畜共患病原菌,常引起奶牛乳房炎等疾病。形成生物被膜是 MRSA 重要的耐药机制之一。研究发现 *ica* 操纵子调控的胞间多糖黏附素(Polysaccharide Intercellular Adhesin, PIA)通过促进 MRSA 的黏附与聚集介导生物被膜形成, *icaA* 和 *icaD* 基因共表达可显著提高 MRSA 的 N-乙酰葡聚糖转移酶活性,但 *icaA/D* 蛋白对 MRSA 生物被膜形成和耐药性的影响仍不清楚。【目的】探讨 *icaA/D* 基因、MRSA 生物被膜形成及耐药性三者之间的相关性,为寻找药物作用新靶点提供科学依据。【方法】以具有多重耐药性且生物被膜形成能力强的乳源 MRSA M5 分离株为研究对象,利用同源重组技术构建其 *icaA/D* 基因缺失株;利用 FITC-ConA 染色结合激光共聚焦显微镜观察野生株与 *icaA/D* 基因缺失株的生物被膜形成过程与能力;采用微量肉汤稀释法测定 14 种抗菌药物对野生株与 *icaA/D* 基因缺失株的最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。【结果】构建了 MRSA M5 的 *icaA/D* 基因缺失株。激光共聚焦显微镜下观察到野生株在培养 16 h 后形成了一层厚的成熟生物被膜,随后开始解离,直至 120 h 完全解离;而 *icaA/D* 基因缺失株在培养后 16 h 仅形成一薄层生物被膜,48 h 完全解离。10 种受试抗菌药物对缺失株的 MIC 较野生株减小,而且缺失株对 8 种药物的敏感性由原来的耐药或中介转变为中介或敏感。【结论】*icaA/D* 基因缺失可明显降低 MRSA 的生物被膜形成能力与耐药性。

关键词:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, *icaA/D* 基因缺失株,生物被膜形成能力,最小抑菌浓度Construction of *icaA/D* gene knock-out in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk for analyzing its biofilm-forming ability and drug resistanceHAN Yuxi^Δ ZHANG Tingting^Δ LÜ Lili LI Jinnian^{*}

College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

Abstract: [Background] Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a multidrug-resistant**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (31672698)^ΔThese authors equally contributed to this work***Corresponding author:** E-mail: lijinnian2000@163.com**Received:** 13-03-2020; **Accepted:** 07-05-2020; **Published online:** 23-07-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31672698)

^Δ对本文贡献相同***通信作者:** E-mail: lijinnian2000@163.com

收稿日期: 2020-03-13; 接受日期: 2020-05-07; 网络首发日期: 2020-07-23

zoonotic pathogen that often causes many diseases such as cow mastitis. Bacterial biofilm-formation is one of the important drug-resistant mechanisms of MRSA. It has been found that the polysaccharide intercellular adhesion (PIA) regulated by *ica* operon, which mediates the biofilm-formation by promoting the adhesion and aggregation of MRSA, and the co-expression of the *icaA* and *icaD* genes can significantly increase the activity of N-acetylglucan transferase in *S. aureus*. However, it is unclear that the effect of the *icaA/D* protein on the biofilm-formation and drug-resistance of MRSA. **[Objective]** To study the relationship among *icaA/D* gene, biofilm-formation and drug-resistance of MRSA and provide a scientific basis for finding new drug targets. **[Methods]** MRSA M5 isolated from mastitis milk, which exhibited a multidrug-resistant and strong biofilm-forming ability, was used to construct the *icaA/D* genes deletion strain by homologous recombination technology. The biofilm-forming ability and process of the MRSA wild strain and *icaA/D* genes deletion strain were assessed by FITC-ConA staining combined with laser confocal microscopy. Finally, the minimum inhibitory concentrations (MICs) of 14 antimicrobial agents to wild strain and *icaA/D* genes deletion strain were detected by broth microdilution method. **[Results]** The *icaA/D* genes deletion strain was successfully constructed. Through observation under a laser confocal microscopy, it was found that the wild strain formed a thick layer of mature biofilm at 16 h. Subsequently, the formed biofilm began to dissociate until 120 h; In contrast, a thin biofilm was formed by *icaA/D* genes deletion strain at 16 h after culture, and completely dissociated at 48 h. Compared with the wild strain, the MICs of 10 tested antimicrobial agents to *icaA/D* genes deletion strain were decreased, and the drug sensitivity of *icaA/D* genes deletion strain to 8 tested antimicrobial agents changed from resistance or intermediation to intermediation or sensitivity. **[Conclusion]** *icaA/D* gene deletion can significantly reduce the biofilm-formation ability and drug-resistance of MRSA.

Keywords: methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *icaA/D* genes deletion strain, biofilm-forming ability, minimum inhibitory concentration

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是一种能够抵抗甲氧西林及其他抗 β -内酰胺酶的人畜共患病原菌^[1]。自比利时学者首次从奶牛乳房炎乳汁中分离到 MRSA^[2]以来,乳源 MRSA 的检出率逐年增加。目前,该菌已成为引起奶牛乳房炎的常见病原菌,严重制约了奶牛养殖业和乳品业的健康发展,也给人类食品安全带来隐患。

细菌生物被膜(Bacterial Biofilm, BF)是细菌为适应生存环境黏附于有生命或无生命物体表面,被自身分泌的胞外多聚物基质包裹的膜状细菌群体^[3]。由于 BF 的屏障作用以及膜态菌生长速度较慢、对抗生素不敏感,甚至分泌抗生素分解酶或表达耐药基因,导致其耐药性较浮游菌增强 10–1 000 倍^[4]。目前已探明形成生物被膜是 MRSA 的重要耐药机制之一,而胞间多糖黏附素(Polysaccharide Intercellular Adhesin, PIA, 又称多聚乙酰氨基葡萄糖胺)依赖机制是 MRSA 生物被膜形

成的主要调控机制。如图 1 所示, *ica* 操纵子是由紧密相连的 *icaA*、*D*、*B*、*C* 这 4 个基因簇和上游阻遏基因 *icaR* 组成^[5], 在该操纵子调控下 MRSA 合成 PIA, 继而 PIA 通过促进 MRSA 的黏附与聚集介导生物被膜形成^[6]。已有文献报道 *icaA* 和 *icaD* 基因(*icaA/D* 基因)的共表达可提高 N-乙酰葡萄糖胺转移酶活性, 从而促进 PIA 合成^[7], 但是, *icaA/D* 基因在 MRSA 形成生物被膜和产生耐药性中的作用仍不清楚。

我们前期从安徽合肥和芜湖地区奶牛养殖场生乳中分离到 38 株乳源 MRSA 菌株, 其中 80% 以上分离株具有多重耐药性, 50% 以上分离株能够形

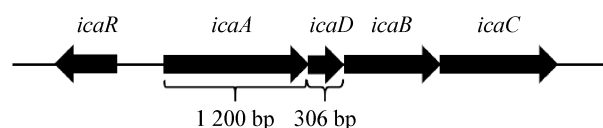


图 1 *ica* 操纵子结构示意图

Figure 1 Schematic diagram of the *ica* operon

成生物被膜, 而且携带 *icaA/D* 基因^[8-9]。本研究以具有多重耐药性且生物被膜形成能力强的乳源 MRSA M5 分离株为研究对象, 利用同源重组技术构建 *icaA/D* 基因缺失株, 通过比较野生株与缺失株的耐药性以及生物被膜性能力, 探讨 *icaA/D* 基因在 MRSA 生物被膜形成和耐药性产生中的作用, 从而为寻找药物作用新靶点、研发有效治疗药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

MRSA M5 分离株和大肠杆菌 DH5 α 菌株, 本实验室保存; 限制性缺陷金黄色葡萄球菌 RN4220 菌株及标准株 ATCC25923, 中国菌株保藏中心; 克隆质粒 pMD19-T simple, TaKaRa 生物公司; 温度敏感型穿梭质粒 pBT₂, 中国科学技术大学生物学重点实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器

PCR Mix、PrimeSTAR Max DNA Polymerase, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 核酸限制性内切酶(*Sal* I、*Eco*R I)和 T4 DNA 连接酶, TaKaRa 生物有限公司; DNA Marker、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒抽提试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒, 上海普洛麦格生物产品有限公司; FITC 标记的刀豆球蛋白(FITC-

ConA), Sigma 公司; LB 培养基和 TSB 培养基, 杭州微生物试剂有限公司; 14 种抗菌药物, 中国兽医药品监察所。

Thermal Cycler PCR 仪和 GenePulser Xcell 电穿孔仪, Bio-Rad 公司; 培清全自动凝胶成像分析系统, 上海培清科技有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 激光共聚焦显微镜, 奥林巴斯有限公司。

1.2 同源重组质粒 pMD19-T simple-*icaAL-icaDR* 的构建与鉴定

1.2.1 引物设计与合成

根据金黄色葡萄球菌 N315 菌株基因组序列 (GenBank 登录号为 NC_002745.2), 在 *icaA* 和 *icaD* 基因外侧上、下游各设计一对同源臂引物 (表 1), 其中引物 P2 和 S1 的 5'端有 20 bp 的反向互补片段, 用于 *icaAL-icaDR* 片段(1 477 bp)的融合。

1.2.2 同源重组质粒的构建与鉴定

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 MRSA M5 分离株基因组 DNA。以细菌基因组 DNA 为模板, 用引物对 P1/P2 和 S1/S2 分别 PCR 扩增 *icaA* 基因的上游 (*icaAL*) 和 *icaD* 基因的下游片段 (*icaDR*)。PCR 反应体系 (25 μ L): 2 \times Taq PCR MasterMix 12.5 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, 上、下游引物 (20 μ mol/L) 各 0.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s,

表 1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)
<i>icaA</i>	F	ATGTCTATTTACTGGATTGTCG	1 200
	R	TTAGCGTTGGGTATTCCCT	
<i>icaD</i>	F	ATGGTCAAGCCCAGGCA	306
	R	TCACGATTCTCTTCCT	
<i>icaA</i> 基因上游同源臂 Upstream of <i>icaA</i> gene	P1	CCGGTCGACCCACTGCTCCAAATTTTGC 下划线部分为 <i>Sal</i> I 酶切位点 The underlined part is <i>Sal</i> I restriction site	725
	P2	TTCTCTCTGTGAACCGACAATCCAGTAA	
<i>icaD</i> 基因下游同源臂 Downstream of <i>icaD</i> gene	S1	TGTCGGTTCACAGAGAGGAAGAGAATCGTG	752
	S2	CCGGAATTCCCCAGCTTTTTTGATTACCGG 下划线部分为 <i>Eco</i> R I 酶切位点 The underlined part is <i>Eco</i> R I restriction site	

51 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经胶回收纯化后按 1:1 比例混合作为模板, 通过 Overlap PCR 扩增 *icaAL-icaDR* 融合基因片段。Overlap PCR 反应体系: PrimeSTAR Max DNA Polymerase 12.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 10.5 μ L。Overlap PCR 反应条件: 先不加引物, 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 100 s, 扩增 10 个循环后; 再加入引物 P1/S2 (20 μ mol/L) 各 1 μ L, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 100 s, 扩增 35 个循环; 72 °C 10 min。Overlap PCR 产物经胶回收纯化后克隆至 pMD19-T simple 载体, 构建同源重组质粒 pMD19-T simple-*icaAL-icaDR*。将重组质粒转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单个菌落进行 PCR 鉴定, 再从阳性克隆中抽提质粒, 送至通用生物公司进行测序鉴定。

1.3 基因敲除质粒 pBT₂-*icaAL-icaDR* 的构建与鉴定

用 *Sal* I/*Eco*R I 双酶切上述同源重组质粒和穿梭质粒 pBT₂。酶切片段经胶回收纯化后用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接 30 min, 构建基因敲除质粒 pBT₂-*icaAL-icaDR*, 并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取转化后单个菌落进行 PCR 和双酶切鉴定, PCR 鉴定条件同 1.2.2。

1.4 基因敲除质粒在 *S. aureus* RN4220 菌株中的修饰

1.4.1 *S. aureus* RN4220 菌株感受态细胞的制备

挑取 *S. aureus* RN4220 菌落接种至 TSB 培养液, 37 °C、150 r/min 培养过夜。次日, 以 1:100 比例转种 TSB 培养液, 37 °C、150 r/min 培养 2–3 h 后加入 1 mL 浓度为 20 mg/mL 溶菌酶, 37 °C 静置 20 min, 冰上预冷 20 min, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀。用 10% 甘油离心洗涤菌体沉淀 5 次, 最后用 500 μ L 10% 甘油重悬菌体沉淀, 分装后 -80 °C 保存备用。

1.4.2 基因敲除质粒电转 RN4220 菌株

将 3–5 μ L pBT₂-*icaAL-icaDR* 与 50 μ L 感受态

细胞混匀, 冰浴 30 min 后迅速电转化。电转化结束后迅速向电转化物中加入 900 μ L 预热的 TSB 培养液, 混匀, 30 °C、130 r/min 培养 1.5 h。随后, 分别取 25、50、100 和 150 μ L 菌液涂布于含 20 μ g/mL 氯霉素(Cm)的 LB 平板上, 30 °C 培养至长出菌落。挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 再从阳性菌落中抽提质粒进行质粒 PCR 和双酶切鉴定。

1.5 MRSA M5 的 *icaA/D* 基因缺失株筛选与鉴定

1.5.1 修饰后的基因敲除质粒电转 MRSA M5 分离株

使用质粒抽提试剂盒抽提在 RN4220 菌株中修饰后的基因敲除质粒, 并采用常规醋酸钠浓缩法加以浓缩。浓缩后的基因敲除质粒按 1.4.2 方法电转化至 MRSA M5 分离株感受态细胞, 并同上进行鉴定。

1.5.2 *icaA/D* 基因缺失株的筛选

将携带基因敲除质粒的 MRSA M5 分离株接种至含 20 μ g/mL Cm 的 LB 平板, 30 °C 培养过夜。次日, 挑取单菌落接种至不含抗生素的 LB 培养液, 42 °C、150 r/min 培养 24 h。之后, 每天按 1:100 比例转种不含抗生素的 LB 培养基, 连续培养 7 代。10 倍梯度稀释第 7 代菌液, 取 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 这 4 个稀释度菌液涂布于不含抗生素的 LB 平板, 30 °C 培养 24 h。随机挑取 112 个菌落分别点种在 LB 平板和含 10 μ g/mL Cm 的 LB 平板上进行培养, 根据同源重组原理^[10], 将在前一种培养基上生长而在后一种培养基上不生长的菌落判为可疑菌落。

1.5.3 *icaA/D* 基因缺失株的鉴定

用 P1/S2 引物对可疑菌落进行菌落 PCR 鉴定, 再将 PCR 阳性菌落接种 LB 平板和含 Cm 的 LB 平板, 再次验证是否为可疑菌落。最后, 分别用 4 对特异性引物(表 1)对第 2 次筛选出的可疑菌落进行组合 PCR 鉴定, 并进行测序验证。

1.6 MRSA M5 野生株及其 *icaA/D* 缺失株的生物被膜检测

采用 FITC-ConA 染色结合激光共聚焦显微镜法^[11]检测 MRSA M5 野生株及其 *icaA/D* 基因缺失株

的生物被膜形成能力及动态形成过程。挑取野生株和缺失株分别接种含 5% 葡萄糖的 TSB 培养液, 30 °C、150 r/min 培养过夜。次日, 用 TSB 培养液将菌液稀释至 0.5 麦氏比浊单位, 并接种预置细胞爬片的 24 孔细胞培养板中, 500 μ L/孔, 每个检测时间点重复 4 孔, 37 °C 培养。分别于培养后 2、6、10、16、24、48、72、96 和 120 h 取出细胞爬片, PBS 洗去未黏附细菌, 2.5% 戊二醛室温固定 1.5 h, PBS 漂洗 3 次, 用 30 μ L FITC-ConA 于 4 °C 避光染色 30 min, PBS 漂洗 3 次, 封片, 激光共聚焦显微镜下观察野生株和缺失株生物被膜形成能力及其动态过程。

1.7 抗菌药物对 MRSA M5 野生株及其 *icaA/D* 缺失株的 MIC 测定

采用美国临床与实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的微量肉汤稀释法^[12]测定 14 种抗菌药物(青霉素、苯唑西林、头孢噻肟、头孢他啶、庆大霉素、丁胺卡那、氯霉素、阿奇霉素、克林霉素、四环素、强力霉素、环丙沙星、替考拉宁、万古霉素)对野生株与缺失株的最低抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC), 同时以金黄色葡萄球菌 ATCC29213 作为质控菌。试验重复 3 次, 根据 CLSI 标准(2019 版)^[12]判定受试菌对测试药物的敏感性。

2 结果与分析

2.1 同源重组质粒的构建与鉴定

PCR 及 Overlap PCR 扩增结果如图 2 所示, 得到两条大小约为 725 bp 与 752 bp 的 DNA 条带 (泳道 1、2), 分别与 *icaAL* 与 *icaDR* 基因片段大小一致; Overlap PCR 和重组质粒 PCR 均扩增到一条大小约为 1 477 bp 的 DNA 条带(泳道 3、4), 与 *icaAL-icaDR* 融合基因片段大小一致。测序结果显示, *icaAL-icaDR* 融合基因片段序列与 N315 参考株相应基因序列(GenBank 登录号为 NC_002745.2)一致, 表明同源重组质粒 pMD19-T simple-*icaAL-icaDR* 构建成功。

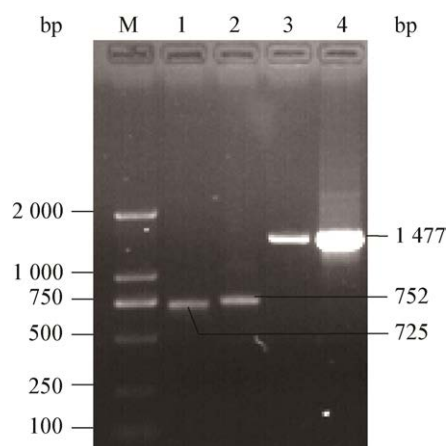


图 2 同源重组质粒 pMD19-T simple-*icaAL-icaDR* 的 PCR 鉴定

Figure 2 PCR identification of homologous recombination plasmid pMD19-T simple-*icaAL-icaDR*

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: *icaAL* PCR 产物(725 bp); 2: *icaDR* PCR 产物(752 bp); 3: Overlap PCR 产物(1 477 bp); 4: pMD19-T simple-*icaAL-icaDR* 的 PCR 产物(1 477 bp)

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR products of *icaAL* (725 bp); 2: PCR products of *icaDR* (752 bp); 3: Overlap PCR products of *icaAL-icaDR* (1 477 bp); 4: PCR products of pMD19-T simple-*icaAL-icaDR* (1 477 bp)

2.2 基因敲除质粒的构建与鉴定

采用酶切酶连方法构建基因敲除质粒 pBT₂-*icaAL-icaDR*, 并进行 PCR 和双酶切鉴定。结果如图 3 所示, 从重组质粒中 PCR 扩增到大小与 *icaAL-icaDR* 融合基因片段大小一致(1 477 bp)的 DNA 条带(泳道 3); 双酶切反应得到两条大小约为 6 970 bp 和 1 477 bp 的 DNA 条带(泳道 4), 分别与预期的 pBT₂ 载体和融合基因片段大小一致。结果表明, 基因敲除质粒 pBT₂-*icaAL-icaDR* 构建成功。

2.3 基因敲除质粒的电转结果

从转化菌(RN4220 及 MRSA M5 菌株)中抽提基因敲除质粒, 并以此为模板均 PCR 扩增到 *icaAL-icaDR* 融合基因片段(图 4 泳道 2、5)。基因敲除质粒经双酶切后均获得大小分别为 6 970 bp 和 1 477 bp 两条 DNA 条带(图 4 泳道 3、6), 分别与空质粒 pBT₂ 及融合基因片段大小一致。结果表明, 基因敲除质粒 pBT₂-*icaAL-icaDR* 在 RN4220 菌株中得到修饰, 修饰后的基因敲除质粒也成功转入 MRSA M5 分离株中。

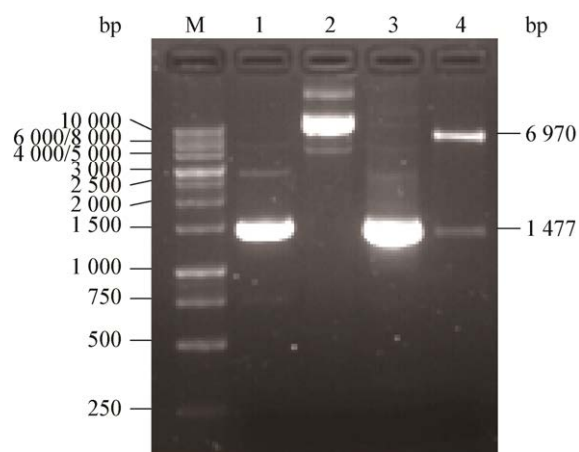


图3 基因敲除质粒 pBT₂-*icaAL-icaDR* 的鉴定

Figure 3 Identification of knockout plasmid pBT₂-*icaAL-icaDR*

注: M: DL10000 DNA Marker; 1: *icaAL-icaDR* 融合基因片段的 PCR 产物对照; 2: 基因敲除质粒 pBT₂-*icaAL-icaDR*; 3: 以 pBT₂-*icaAL-icaDR* 为模板扩增融合基因片段的 PCR 产物; 4: 基因敲除质粒 pBT₂-*icaAL-icaDR* 的双酶切产物

Note: M: DL10000 DNA Marker; 1: PCR products control of *icaAL-icaDR* fusion gene fragment; 2: Knockout plasmid pBT₂-*icaAL-icaDR*; 3: PCR products of *icaAL-icaDR* fusion gene fragment amplified using pBT₂-*icaAL-icaDR* as template; 4: Double enzyme digestion products of knockout plasmid pBT₂-*icaAL-icaDR*

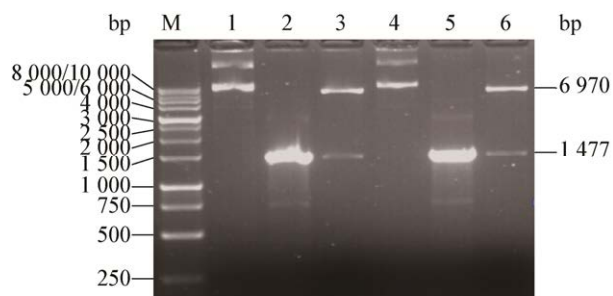


图4 基因敲除质粒 pBT₂-*icaAL-icaDR* 的电转结果

Figure 4 The electroporation result of knockout plasmid pBT₂-*icaAL-icaDR*

注: M: DL10000 DNA Marker; 1: 从 RN4220 菌株中抽提的 pBT₂-*icaAL-icaDR* (pBT₂-*icaAL-icaDR*/RN4220); 2: 以 pBT₂-*icaAL-icaDR*/RN4220 为模板扩增的融合基因片段 PCR 产物; 3: pBT₂-*icaAL-icaDR*/RN4220 的双酶切产物; 4: 从 MRSA M5 菌株中抽提的 pBT₂-*icaAL-icaDR* (pBT₂-*icaAL-icaDR*/MRSA M5); 5: 以 pBT₂-*icaAL-icaDR*/MRSA M5 为模板扩增的融合基因片段 PCR 产物; 6: pBT₂-*icaAL-icaDR*/MRSA M5 的双酶切产物

Note: M: DL10000 DNA Marker; 1: pBT₂-*icaAL-icaDR*/RN4220; 2: PCR products of fusion gene fragment amplified from pBT₂-*icaAL-icaDR*/RN4220; 3: Double enzyme digestion products of pBT₂-*icaAL-icaDR*/RN4220; 4: pBT₂-*icaAL-icaDR*/MRSA M5; 5: PCR products of fusion gene fragment amplified from pBT₂-*icaAL-icaDR*/MRSA M5; 6: Double enzyme digestion products of pBT₂-*icaAL-icaDR*/MRSA M5

2.4 *icaA/D* 基因缺失株的筛选与鉴定

将含基因敲除质粒的 MRSA M5 分离株在 LB 培养基上连续培养 7 代, 随机挑取 112 个菌落点在 LB 培养基和含 Cm 的 LB 培养基上进行抗性筛选。共筛选到 23 个在 LB 培养基上生长但在含 Cm 的 LB 培养基上不生长的可疑菌落(图 5 箭头处)。对可疑菌落进行菌落 PCR 鉴定, 结果如图 6 所示, 仅从 3 个可疑菌落(编号为 24、60、105)中扩增到 *icaAL-icaDR* 融合基因片段; 再次将这 3 个可疑菌落进行抗性筛选, 结果发现其均在 LB 培养基上生长但在含 Cm 的 LB 培养基上不生长, 提示其为疑似缺失株。

分别用 *icaAF/icaDR*、P1/*icaDR*、*icaAF/S2* 和 P1/S2 这 4 对特异性引物对疑似缺失株进行组合 PCR 鉴定。结果由图 7 所示, 从野生株中扩增出符合 *icaA/D* (1 469 bp)、*icaAL-icaA/D* (2 202 bp)、*icaA/D-icaDR* (2 229 bp)和 *icaAL-icaA/D-icaDR*

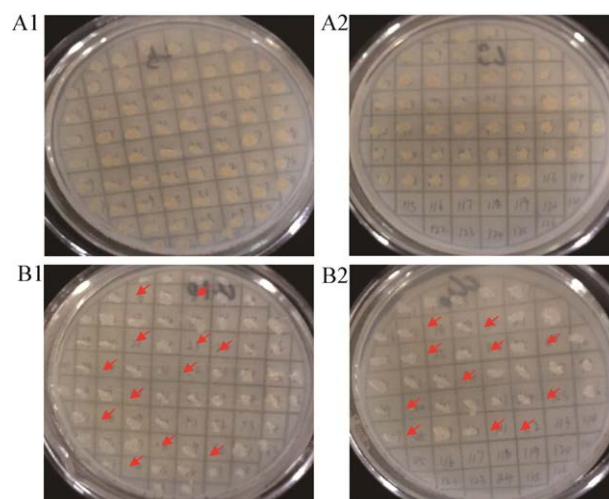


图5 可疑菌落的抗性筛选结果

Figure 5 The suspicious colonies screened by resistance of antibiotics

注: A1 和 A2: 112 个菌落在 LB 平板上点种生长情况; B1 和 B2: 112 个菌落在含 Cm 的 LB 平板上点种生长情况

Note: A1, A2: Growth status of 112 colonies seeded on LB plates; B1, B2: Growth status of 112 colonies seeded on LB plates containing Cm

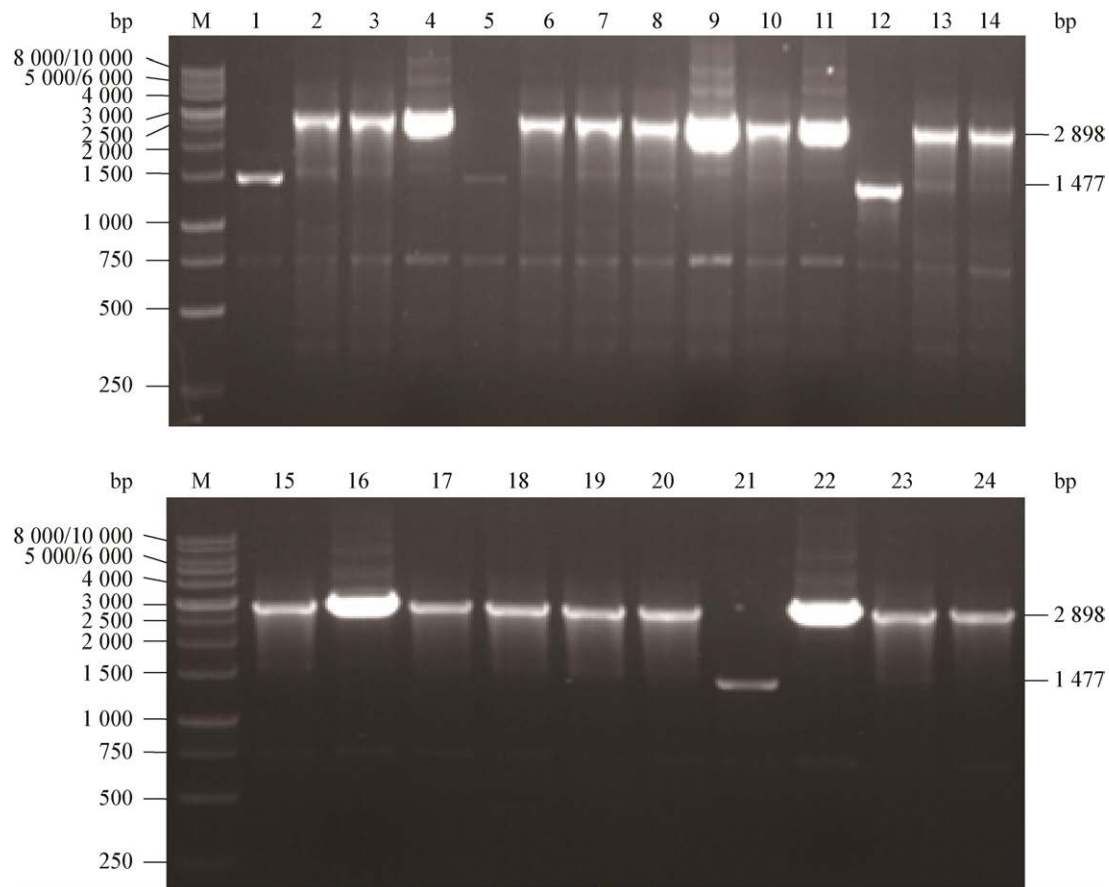


图 6 可疑菌落的 PCR 鉴定

Figure 6 PCR identification of the suspected colonies

注: M: DL10000 DNA Marker; 1: *icaAL-icaDR* 融合基因片段的 PCR 产物对照; 2-24: 23 个可疑菌落的 PCR 产物

Note: M: DL10000 DNA Marker; 1: PCR products control of *icaAL-icaDR* fusion gene fragment; 2-24: The PCR products of 23 suspicious colonies

(2 898 bp)预期片段大小的 4 条 DNA 条带(泳道 1、5、9、13); 3 株疑似缺失株均扩增出 *icaAL-icaDR* 融合基因片段(1 779 bp) (泳道 14、15、16), 但均未扩增到 *icaA/D*、*icaAL-icaA/D* 和 *icaA/D-icaDR* 基因片段。测序结果显示, 疑似缺失株 105 中携带的 *icaAL-icaDR* 融合基因片段序列未发生任何突变与缺失; 疑似缺失株 24 的相应序列中有两处发生了点突变(第 121 位 C→G, 第 494 位 A→T); 缺失株 60 的相应序列中第 109 位碱基 A 缺失。结果表明疑似缺失株 105 为构建成功的 *icaA/D* 基因缺失株 (MRSA M5- Δ *icaA/D*)。

2.5 MRSA M5 分离株及其 *icaA/D* 基因缺失株形成的生物被膜

如图 8 和图 9 所示, 野生株培养 6 h 后即发出绿色荧光; 随着培养时间延长, 荧光强度逐渐增强, 16 h 达到最高, 形成一厚层成熟的生物被膜; 随后, 荧光强度逐渐减弱, 至培养后 120 h 生物被膜完全解离, 视野内不再出现荧光。缺失株在培养后 16 h 形成了一薄层生物被膜, 随后开始解离, 至 48 h 生物被膜完全解离。结果表明, *icaA/D* 基因缺失株的生物被膜形成能力显著下降。

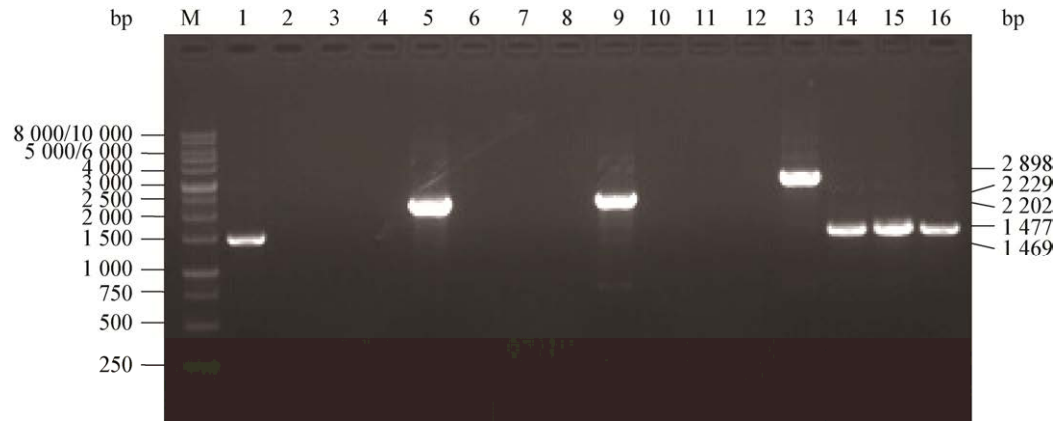


图 7 *icaA/D* 基因疑似缺失株的组合 PCR 鉴定

Figure 7 Multiple-PCR identification of the suspected *icaA/D* gene deletion strain

注：M：DL10000 DNA Marker；1-4：引物对为 *icaAF/icaDR*；5-8：引物对为 P1/*icaDR*；9-12：引物对为 *icaAF/S2*；13-16：引物对为 P1/*S2*；1、5、9、13：模板为野生株的基因组 DNA；2、6、10、14：模板为疑似缺失株 24 的基因组 DNA；3、7、11、15：模板为缺失株 60 的基因组 DNA；4、8、12、16：模板为缺失株 105 的基因组 DNA

Note: M: DL10000 DNA Marker; 1-4: Primer pairs *icaAF/icaDR*; 5-8: Primer pairs P1/*icaDR*; 9-12: Primer pairs *icaAF/S2*; 13-16: Primer pairs P1/*S2*; 1, 5, 9, 13: Genome DNA of the wild strain as template; 2, 6, 10, 14: Genome DNA of the suspected deletion strain 24 as template; 3, 7, 11, 15: Genome DNA of the suspected deletion strain 60 as template; 4, 8, 12, 16: Genome DNA of the suspected deletion strain 105 as template

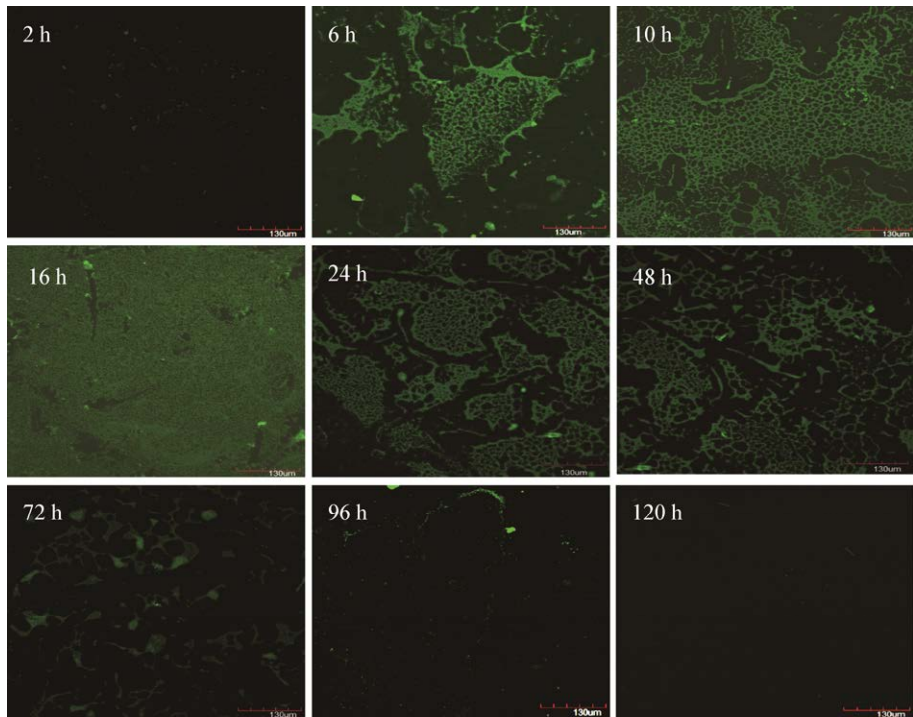


图 8 MRSA M5 野生株的生物被膜形成过程

Figure 8 Biofilm formation process of the MRSA M5 wild strain

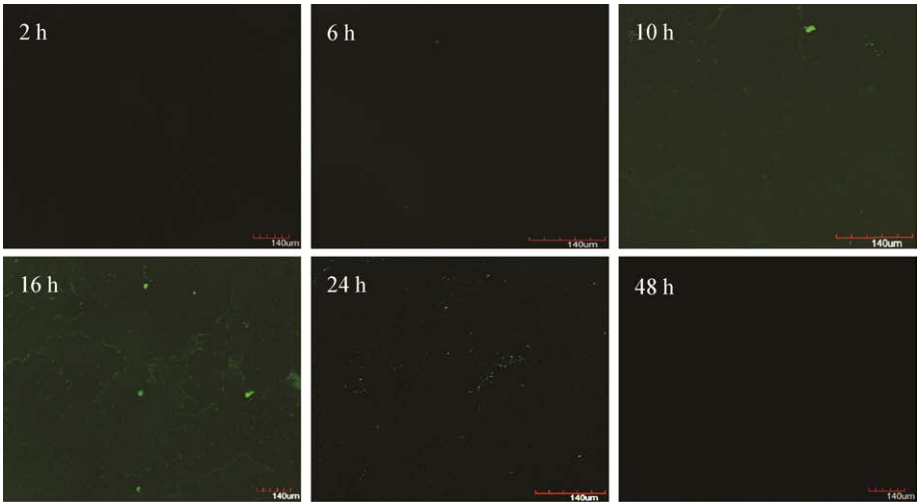


图 9 MRSA M5- Δ *icaA/D* 缺失株的生物被膜形成过程
Figure 9 Biofilm formation process of the MRSA M5- Δ *icaA/D* strain

2.6 MRSA M5 分离株及其 *icaA/D* 基因缺失株的耐药性

采用微量肉汤稀释法测定 14 种抗菌药物对野生株与缺失株的 MIC 值。结果如表 2 所示, 野生株除对替考拉宁和万古霉素敏感以及对丁胺卡那中介外, 对其余 11 种测试药物均表现耐药。与野生

株相比, 10 种受试抗菌药物对缺失株的 MIC 明显减小, 并且导致缺失株对其中 8 种药物的敏感性发生了改变, 由原来的耐药或中介转变为中介(四环素、环丙沙星)或敏感(头孢噻肟、头孢他啶、阿奇霉素、克林霉素、强力霉素、丁胺卡那)。结果表明 *icaA/D* 基因缺失株对抗菌药物的耐药性明显降低。

表 2 MRSA M5 野生株及其 *icaA/D* 缺失株对 14 种抗菌药物的敏感性检测
Table 2 The drug sensitivity of the MRSA M5 wild strain and MRSA M5- Δ *icaA/D* strain to 14 kinds of antibiotics

抗菌药物 Antibiotics	CLSI 标准 Standard of Clinical and Laboratory Standards Institute (μg/mL)			最小抑菌浓度 Minimum inhibitory concentration (MIC) (μg/mL)		药物敏感性 Drug sensitivity	
	敏感	中介	耐药	MRSA M5 wild strain	MRSA M5- Δ <i>icaA/D</i> strain	MRSA M5 wild strain	MRSA M5- Δ <i>icaA/D</i> strain
	S	I	R				
青霉素 PEN	≤0.12	—	≥0.25	128, 128, 128	32, 32, 32	R	R
苯唑西林 OXA	≤2.00	—	≥4.00	128, 256, 128	4, 4, 4	R	R
头孢噻肟 CTX	≤8.00	16–32	≥64.00	256, 256, 256	4, 4, 4	R	S
头孢他啶 CAZ	≤8.00	16	≥32.00	64, 64, 64	4, 4, 4	R	S
庆大霉素 GEN	≤4.00	8	≥16.00	64, 64, 64	32, 32, 32	R	R
丁胺卡那 AK	≤16.00	32	≥64.00	32, 32, 32	0.5, 0.5, 0.5	I	S
氯霉素 CHL	≤8.00	16	≥32.00	64, 64, 16	32, 32, 32	R	R
阿奇霉素 AZM	≤2.00	4	≥8.00	128, 128, 128	1, 1, 1	R	S
克林霉素 DA	≤0.50	1–2	≥4.00	4, 4, 4	0.5, 0.5, 0.5	R	S
四环素 TCY	≤4.00	8	≥16.00	16, 16, 16	8, 8, 8	R	I
强力霉素 DOX	≤4.00	8	≥16.00	64, 64, 64	4, 4, 4	R	S
环丙沙星 CIP	≤1.00	2	≥4.00	16, 16, 16	2, 2, 2	R	I
替考拉宁 TEC	≤8.00	16	≥32.00	1, 1, 1	2, 2, 2	S	S
万古霉素 VA	≤2.00	—	≥16.00	1, 1, 1	2, 2, 2	S	S

注: S: 敏感; I: 中敏; R: 耐药
Notes: S: Sensitivity; I: Intermediation; R: Resistance

3 讨论与结论

耐甲氧西林葡萄球菌(MRSA)生物被膜(Biofilm)的形成机制十分复杂,主要包括PIA依赖与非依赖机制。在PIA依赖机制中,由 $icaA/D$ 基因参与组成的 ica 操纵子调控PIA的合成^[13],PIA可促进MRSA黏附与聚集,介导生物被膜的形成^[14]。已有研究表明 $icaA$ 蛋白具有较弱的N-乙酰葡聚糖转移酶活性, $icaA$ 和 $icaD$ 基因共表达时可显著提高N-乙酰葡聚糖转移酶活性^[15]。我们推测 $icaA$ 基因和 $icaD$ 基因是影响MRSA生物被膜形成的关键调控因子。对此,本研究通过构建MRSA M5分离株的 $icaA/D$ 基因缺失株,探究 $icaA/D$ 蛋白对MRSA M5分离株生物被膜形成及其耐药性的影响,研究结果可为从抑制生物被膜形成角度防治MRSA感染提供科学依据。

pBT₂是一种可在大肠杆菌与葡萄球菌之间穿梭且有温度敏感性和抗性标记的质粒^[16],因此本研究选择使用该穿梭质粒构建敲除质粒pBT₂- $icaAL$ - $icaDR$ 。值得注意的是,基因敲除质粒来源于大肠杆菌,直接转入MRSA M5分离株会因不同的宿主特异性识别系统而被菌体内核酸酶降解^[17]。但敲除质粒在RN4220菌株中可经复制、加工和修饰,获得金黄色葡萄球菌的识别系统而被MRSA M5分离株所接受^[18]。

BF形成是一个包括黏附、聚集、成熟和分离4个阶段^[19]的动态过程。本研究中利用FITC-ConA染色结合激光共聚焦显微镜方法比较了野生株与 $icaA/D$ 基因缺失株的生物被膜形成过程与能力^[11],结果显示野生株在培养后16 h可形成一厚层生物被膜,而 $icaA/D$ 基因缺失株形成了一薄层生物被膜,表明 $icaA/D$ 基因缺失株的生物被膜形成能力明显降低。同时,我们也检测了14种抗菌药物对野生株与缺失株的MIC值,结果发现缺失株对8种药物的敏感性由原来的耐药或中介转变为中介或敏感,耐药性明显下降。由此推测, $icaA/D$ 蛋白可能是通过促进MRSA生物被膜形成来增加其耐药性

的,但要证明此结论,不仅需构建 $icaA/D$ 基因缺失株的回补株进行表型试验,还需要比较能形成生物被膜的缺失株与不能形成生物被膜的缺失株和未缺失株三者之间的耐药性。

REFERENCES

- [1] Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals[J]. *Epidemiology & Infection*, 2010, 138(5): 606-625
- [2] Conceição T, de Lencastre H, Aires-de-Sousa M. Healthy bovines as reservoirs of major pathogenic lineages of *Staphylococcus aureus* in Portugal[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2017, 23(7): 845-851
- [3] Dufour D, Leung V. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance[J]. *Endodontic Topics*, 2010, 22(1): 2-16
- [4] Dakheel KH, Rahim RA, Neela VK, Al-Obaidi JR, Hun TG, Yusoff K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms and their influence on bacterial adhesion and cohesion[J]. *BioMed Research International*, 2016, 2016: 4708425
- [5] Hoang TM, Zhou C, Lindgren JK, Galac MR, Corey B, Endres JE, Olson ME, Fey PD. Transcriptional Regulation of $icaADBC$ by both IcaR and TcaR in *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(6): e00524-18
- [6] Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O'Gara JP. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(3): 1153-1165
- [7] Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, Otto F. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system[J]. *Cellular Microbiology*, 2004, 6(3): 269-275
- [8] Zhou HH, Liu ZQ, Li JN, Xiang YQ, Fan YN, Xia SL, Yao L, Wang WP, Huang Y. Antimicrobial resistance, toxigenicity and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2015, 42(4): 529-535 (in Chinese)
周欢欢, 刘子琦, 李瑾年, 相翊卿, 范亚楠, 夏生林, 姚露, 王文平, 黄影. 乳源耐甲氧西林葡萄球菌的耐药性、产毒性与生物膜形成能力检测[J]. *安徽农业大学学报*, 2015, 42(4): 529-535
- [9] Fan YN, Xiang YQ, Liu ZQ, Li JN, Xia SL, Xu JY. Distribution, drug resistance and virulence gene detection of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk in Wuhu

- reagen[J]. Chinese Journal of Microecology, 2015, 27(11): 1266-1271,1275 (in Chinese)
- 范亚楠, 相翊卿, 刘子琦, 李槿年, 夏生林, 许家玉. 芜湖地区生牛奶中金黄色葡萄球菌的污染状况及其耐药性和毒力基因检测[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(11): 1266-1271,1275
- [10] Dai K, Wen XT, Chang YF, Cao SJ, Zhao Q, Huang XB, Wu R, Huang Y, Yan QG, Han XF, et al. A streptomycin resistance marker in *H. parasuis* based on site-directed mutations in *rpsL* gene to perform unmarked in-frame mutations and to verify natural transformation[J]. PeerJ, 2018, 6: e4253
- [11] Schlafer S, Meyer RL. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 138: 50-59
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S29 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019
- [13] Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease[J]. Virulence, 2011, 2(5): 445-459
- [14] Chopra S, Harjai K, Chhibber S. Antibiotic susceptibility of *ica*-positive and *ica*-negative MRSA in different phases of biofilm growth[J]. The Journal of Antibiotics, 2015, 68(1): 15-22
- [15] Arciola CR, Campoccia D, Ravaoli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015, 5: 7
- [16] Cui BT, Smooker PM, Rouch DA, Deighton MA. Enhancing DNA electro-transformation efficiency on a clinical *Staphylococcus capitis* isolate[J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 109: 25-30
- [17] Wu YC, Meng YY, Ding BX, Han HY, Qu D, Bai L. Application of plasmid-based allelic replacement in the gene deletion of *Staphylococcus*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35(7): 581-586 (in Chinese)
- 武有聪, 孟媛媛, 丁百兴, 韩海燕, 瞿涤, 白丽. 以质粒为基础的同源重组技术在葡萄球菌基因敲除中的应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(7): 581-586
- [18] Nair D, Memmi G, Hernandez D, Bard J, Beaume M, Gill S, Francois P, Cheung AL. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(9): 2332-2335
- [19] de Oliveira MMM, Brugnera DF, Alves E, Piccoli RH. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2010, 41(1): 97-106