

## 研究报告

表皮葡萄球菌 *vraSR-srrAB* 突变株的构建及生物学表型陈晓婷<sup>1</sup>, 乾莲<sup>1</sup>, 陈卫国<sup>1</sup>, 孙士正<sup>1</sup>, 白宗凯<sup>1</sup>, 赵纯静<sup>1</sup>, 武有聪<sup>\*1,2</sup>

1 大理大学基础医学院病原生物学综合实验室, 云南 大理 671000

2 大理大学基础医学院医学微生物学及免疫学教研室, 云南 大理 671000

陈晓婷, 乾莲, 陈卫国, 孙士正, 白宗凯, 赵纯静, 武有聪. 表皮葡萄球菌 *vraSR-srrAB* 突变株的构建及生物学表型[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3562-3574.

CHEN Xiaoting, QIAN Lian, CHEN Weiguo, SUN Shizheng, BAI Zongkai, ZHAO Chunjing, WU Youcong. Construction and biological phenotype characterization of *vraSR-srrAB* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3562-3574.

**摘要:** 【背景】形成生物被膜是表皮葡萄球菌的主要致病方式, 双组分系统(two-component regulatory system, TCS) *VraSR* 和 *SrrAB* 与细菌的生长、生物被膜形成等多种生物学表型密切相关。敲除表皮葡萄球菌 SE1457 *vraSR* 后细胞壁变薄, 生物被膜形成量降低, 而敲除 *srrAB* 后生长进入稳定期的时间延长, 生物被膜形成量也降低, 且 TCS-*VraSR* 和 *SrrAB* 均通过 *ica* 途径调控表皮葡萄球菌生物被膜的形成。*ica* 操作子是表皮葡萄球菌生物被膜形成的重要调节元件, 由 *icaADBC* 这 4 个开放阅读框(open reading frame, ORF)和 1 个转录方向相反的 *icaR* 组成, *IcaR* 是 *icaADBC* 的抑制子。【目的】探索 TCS-*VraSR* 和 *SrrAB* 协同调控表皮葡萄球菌生长及生物被膜形成中的作用, 为防控表皮葡萄球菌引起的持续性感染奠定基础。【方法】构建 pKOR1- $\Delta$ *vraSR* 重组质粒, 经大肠杆菌 DC10B 修饰后转入  $\Delta$ *srrAB*, 通过同源重组在  $\Delta$ *srrAB* 突变株的基础上进一步敲除 *vraSR* 基因, 疑似  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 突变株经 PCR、RT-PCR 和测序验证。检测  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 突变株的生长、生物被膜形成及药物敏感性。【结果】成功构建表皮葡萄球菌  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 突变株。与表皮葡萄球菌 SE1457 野生株、 $\Delta$ *vraSR* 和  $\Delta$ *srrAB* 突变株相比,  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 突变株生长更为迟缓, 药物敏感性增强, 几乎不能形成生物被膜; RT-qPCR 显示,  $\Delta$ *vraSR* 和  $\Delta$ *srrAB* 突变株中 *icaA* 转录水平较 SE1457 下调约 13%–17%, *icaR* 转录水平上调约 5–9 倍, 而  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 突变株中 *icaA* 转录水平较 SE1457 下调约 6%, *icaR* 转录水平上调约 14 倍。【结论】*VraSR-SrrAB* 可能通过 *ica* 途径协同

资助项目: 国家自然科学基金(82060380, 81660346); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(202305AC160038); 复旦大学教育部/卫健委医学分子病毒学重点实验室开放课题(FDMV-2021002)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82060380, 81660346), the Young and Middle-aged Academic Technical Leaders Leader Reserve Talent Project of Yunnan Province (202305AC160038), and the Open Research Projects of Key Laboratory (MOE/MOH) of Medical Molecular Virology of Fudan University (FDMV-2021002).

\*Corresponding author. E-mail: youcongwu@163.com

Received: 2022-10-14; Accepted: 2023-01-01; Published online: 2023-02-14

调控表皮葡萄球菌生物被膜形成, 对压力应激胁迫作用还需进一步研究。

关键词: *VraSR*; *SrrAB*; 双组分信号转导系统; 生物被膜; 表皮葡萄球菌

## Construction and biological phenotype characterization of *vraSR-srrAB* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*

CHEN Xiaoting<sup>1</sup>, QIAN Lian<sup>1</sup>, CHEN Weiguo<sup>1</sup>, SUN Shizheng<sup>1</sup>, BAI Zongkai<sup>1</sup>, ZHAO Chunjing<sup>1</sup>, WU Youcong<sup>\*1,2</sup>

1 Integrated Laboratory of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China

2 Department of Medical Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China

**Abstract: [Background]** Biofilm formation is the major pathogenic factor of *Staphylococcus epidermidis*. The two-component regulatory system (TCS) composed of *VraSR* and *SrrAB* is involved in the growth, biofilm formation and the other biological phenotypes of bacteria. The deletion of *vraSR* leads to thinner cell wall and decreased biofilm formation, and the deletion of *srrAB* results in lagged growth before the stationary phase and decreased biofilm formation of *S. epidermidis* 1457 (SE1457). Both *VraSR* and *SrrAB* modulate biofilm formation in an *ica*-dependent manner. The *ica* operon is a key regulatory element of biofilm formation in *S. epidermidis*, which is composed of four genes (*icaADBC*) and a transcriptional repressor (*icaR*). **[Objective]** To explore the synergistic regulation of TCS-*VraSR* and *SrrAB* on the growth and biofilm formation of *S. epidermidis*, so as to lay a foundation for the prevention and control of persistent infection caused by *S. epidermidis*. **[Methods]** The recombinant plasmid pKOR1- $\Delta$ *vraSR* was constructed, modified by *E. coli* DC10B, and transformed into  $\Delta$ *srrAB*. The *vraSR* gene was deleted from the genome of  $\Delta$ *srrAB* by homologous recombination. The suspected  $\Delta$ *vraSR-srrAB* was verified by PCR, RT-PCR, and sequencing. The growth, biofilm formation, and drug susceptibility of  $\Delta$ *vraSR-srrAB* were examined. **[Results]**  $\Delta$ *vraSR-srrAB* was successfully constructed. Compared with SE1457,  $\Delta$ *vraSR*, and  $\Delta$ *srrAB*,  $\Delta$ *vraSR-srrAB* exhibited retarded growth, increased drug susceptibility, and decreased biofilm formation. The RT-qPCR showed that the deletion of *vraSR* or *srrAB* down-regulated the transcriptional level of *icaA* by 13%–17% and up-regulated that of *icaR* by 5–9 folds compared with that in SE1457. The deletion of both *vraSR* and *srrAB* down-regulated the transcriptional level of *icaA* by 6% and up-regulated that of *icaR* by 14 folds compared with that in SE1457. **[Conclusion]** *VraSR* and *SrrAB* may cooperatively regulate the biofilm formation of *S. epidermidis* through the *ica* pathway, and the mechanism of *VraSR* and *SrrAB* in modulating the responses to stress remains to be studied.

**Keywords:** *VraSR*; *SrrAB*; two-component regulatory system; biofilm; *Staphylococcus epidermidis*

表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)是一种机会致病菌,其主要在介入性生物材料(人工瓣膜、心脏起搏器、假体关节等)表面形成生物被膜而致病。作为细菌的巢穴,生物被膜结构的形成能庇护细菌抵抗抗生素的作用和宿主免疫防御攻击,进而引起耐药性增加和持续性感染<sup>[1-3]</sup>。目前尚无有效治疗细菌生物被膜感染的方法,唯一可行的办法是更换植入物,但会给患者带来巨大的经济负担和精神压力<sup>[4-6]</sup>。

双组分信号转导系统(two-component regulatory system, TCS)由 2 个蛋白组成,膜蛋白感受器(sensor)能感应环境中压力因子的变化,并通过磷酸化形式将压力因素传递至胞浆内的反应调节蛋白(regulator),进而调控靶基因的转录,参与细菌的多种生物学功能,如生长代谢、生物被膜形成、药物敏感性、毒力和自溶等<sup>[7-8]</sup>。万古霉素耐药相关双组分系统(vancomycin resistance-associated sensor and regulator, *VraSR*)感应的信号是细胞壁压力因子(如万古霉素、青霉素等),表皮葡萄球菌 *VraSR* 主要通过代谢间接调控药物敏感性,并通过 *ica* 途径调控生物被膜的形成,敲除 *vraSR* 后表皮葡萄球菌细胞壁变薄,抵抗环境压力的耐受性降低,生物被膜形成量减少 40%–60%<sup>[9-10]</sup>。葡萄球菌呼吸相关双组分系统(staphylococcal respiratory response, *SrrAB*)能感应环境中的氧浓度变化。有氧条件下,表皮葡萄球菌 *SrrAB* 主要通过 *qoxBACD* 调控细菌的生长,厌氧条件下通过 *nrdDG* 和 *pflBA* 调控细菌的生长。此外,表皮葡萄球菌 *SrrAB* 以 *ica* 依赖的方式调控生物被膜的形成:有氧条件下 *SrrAB* 通过上调 *icaA* 转录,促进表皮葡萄球菌生物被膜的形成;厌氧条件下通过上调 *icaR* 的转录,部分抑制了 *icaA* 的转录,导致生物被膜形成量较有氧条件下明显减少,敲除 *srrAB* 后生物被膜形成量减少约 80%<sup>[11-13]</sup>。

上述两组 TCS 均与表皮葡萄球菌的重要生物学表型(如生长、生物被膜形成及药物敏感性)相关,且均通过 *ica* 途径调控表皮葡萄球菌生物被膜形成<sup>[14]</sup>。然而 *VraSR* 与 *SrrAB* 共同调控表皮葡萄球菌生长及生物被膜形成的机制尚不清楚。本文在前期研究基础上,通过同源重组技术进一步构建 $\Delta$ *vraSR-srrAB* 突变株,以探索 TCS-*VraSR* 与 *SrrAB* 在表皮葡萄球菌生长及生物被膜形成中的相互作用,为研发抗葡萄球菌生物被膜药靶提供参考<sup>[15-16]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

大肠埃希菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  购自生工生物工程(上海)股份有限公司;表达载体 pET28a(+)购自 Novagen 公司;表皮葡萄球菌标准株 ATCC 35984 (BF+)、ATCC 12228 (BF-)和 SE1457 野生株由本实验室保存;*vraSR* 基因敲除株( $\Delta$ *vraSR*)、*icaC* 基因敲除株( $\Delta$ *icaC*)、*atlE* 基因敲除株( $\Delta$ *atlE*)和 *srrAB* 基因敲除株( $\Delta$ *srrAB*)<sup>[11]</sup>是在 SE1457 菌株的基础上通过同源重组的方法得到,由本实验室保存;金黄色葡萄球菌 RN4220、大肠杆菌 DC10B 和穿梭质粒 pKOR1 由本实验室保存。

#### 1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

胰蛋白胨大豆酵母浸膏肉汤培养基(tryptone soya broth, TSB)、MH 琼脂培养基(mueller-Hinton, MH)、 $\beta$ -巯基乙醇、结晶紫均购自北京 Solarbio 公司; $B_2$  培养基参考文献[17]配制。质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、 $2\times$ Taq PCR Master Mix、DNA Marker, 北京 Tiangen 生物公司;限制性内切酶(*Xho* I、*EcoR* I、*BamH* I)、T4 DNA 连接酶, Thermo Scientific 公司;氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉

素、环丙沙星、万古霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 溶葡萄球菌酶(lysostaphin), Sigma 公司; RNA 小量抽提试剂盒(RNeasy-mini Kit), Qiagen 公司; BP Clonase™ II Enzyme Mix, Invitrogen 公司; HiScript RT SuperMix for qPCR (+gDNAwiper)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、细菌 DNA 提取试剂盒、高保真酶, 南京 Vazyme 生物公司; 引物合成及 DNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。StepOne Real-Time PCR System 和 PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 恒温培养箱、恒温摇床, 上海一恒科技有限公司; 微量移液器、高速冷冻离心机、小型高速离心机, Eppendorf 公司; 琼脂糖凝胶电泳仪, 北京市六一仪器厂; 组织匀浆仪、电击转化仪, Bio-Rad 公司; 酶标仪, Beckman 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 *vraSR* 基因上、下游同源臂克隆及融合片段获取

将表皮葡萄球菌 SE1457 基因组 DNA 作为模板, 以 SR-U-*EcoR* I-F/SR-U-*Xho* I-R 为引物对扩增 *vraSR* 基因上游同源臂(up stream, US), 以 SR-D-*Bam*H I-F/SR-D-*EcoR* I-R 为引物对扩增 *vraSR* 基因下游同源臂(down stream, DS) (表 1), 切胶回收。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 2 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 反应体系(25 μL): 模板 DNA (500 ng/μL) 1 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 2×*Taq* PCR Master Mix 12.5 μL, 超纯水 10.5 μL。将纯化的 pET28a 和 DS 分别双酶切(*Bam*H I/*Eco*R I)后连接, 热激转化并获得阳性克隆后筛选鉴定, 与 US 纯化片段分别进行双酶切(*Eco*R I/*Xho* I), 在 T4 连接酶的作用下进行连接反应, 构建 pET28a-DS-US 重组质粒。PCR 反应体系(50 μL): pET28a-DS-US 1 μL, 引物对

SR-D-attB1-F/SR-U-attB2-R (10 μmol/L)各 0.5 μL, 5×Primer STAR Buffer (mg<sup>2+</sup> plus) 10 μL, dNTP Mixture 4 μL, 超纯水 34 μL。PCR 反应条件: 98 °C 5 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。扩增获得的 PCR 片段(attB1-DS-US-attB2)与质粒 pKOR1 进行 BP 反应(BP Clonase)以获得 pKOR1- $\Delta$ *vraSR* 重组质粒<sup>[17]</sup>。

### 1.2.2 表皮葡萄球菌 1457 $\Delta$ *srrAB* 突变株感受态细胞制备

取 500 μL 37 °C、220 r/min、TSB 培养基培养过夜菌按 1% (体积分数)接种量稀释转接于 50 mL 锥形瓶中, 37 °C、220 r/min 振荡培养至 *OD*<sub>600</sub> 约为 0.5; 将菌液冰浴 10 min, 4 °C、4 000×g 离心 10 min 弃上清; 加入预冷的 50 mL 0.5 mol/L 蔗糖溶液重悬浮细胞, 4 °C 冰浴 15 min, 4 000×g 离心 10 min 弃上清; 重复洗涤 1 次; 加入 800 μL 预冷的 0.5 mol/L 蔗糖溶液悬浮细胞, 冰浴 10 min, 混匀后分装(100 μL/管), -80 °C 保存。

### 1.2.3 重组质粒 pKOR1- $\Delta$ *vraSR* 修饰、电击转化及突变株的筛选

重组质粒 pKOR1- $\Delta$ *vraSR* 热激转化入大肠杆菌 DC10B 后, 提取质粒再电击(电压 2.5 kV, 电容 25 μF, 电阻 100 Ω)转入表皮葡萄球菌  $\Delta$ *srrAB* 突变株, 加入 B<sub>2</sub> 培养基复苏, 30 °C、220 r/min 培养 1 h 后涂板(含 10 μg/mL 氯霉素 TSA), 30 °C 培养 48 h。阳性克隆培养后 1:10 000 倍稀释, 涂板(含 50 ng/mL 脱水四环素 TSA)后 30 °C 培养, 在含氯霉素 TSA 平板上不生长, 无抗性 TSA 平板上生长的菌落为  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 疑似突变株。

### 1.2.4 $\Delta$ *vraSR-srrAB* 突变株的鉴定

采用细菌 DNA 提取试剂盒抽提疑似  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 突变株基因组 DNA, 以 *vraSR*-U-F/*vraSR*-D-R 为引物对进行 PCR 扩增, SE1457 基因组作为对照。采用 RNeasy-mini Kit 抽提 SE1457 及其同源性突变株的 RNA 并逆转录为 cDNA,

表 1 用于基因敲除 *vraSR-srrAB* 突变株构建和验证的引物Table 1 Primers used in the construction and validation of *vraSR-srrAB* knockout mutant

Primer	Sequence (5'→3')	Location	Restriction enzyme	Product size (bp)
Construction of <i>vraSR-srrAB</i> knockout mutant				
SR-D- <i>Bam</i> H I-F	<u>CGCGGATCCT</u> TATTAGCACTTTTCCCAATG	1 483 778–1 483 797	<i>Bam</i> H I	1 019
SR-D- <i>Eco</i> R I-R	CCGGAATTCTAATTCAATAAATTATTAAGGCG	1 484 726–1 484 749	<i>Eco</i> R I	1 019
SR-U- <i>Eco</i> R I-F	CCGGAATTCTAGTGATTTCATCTGTAAATC	1 486 394–1 486 413	<i>Eco</i> R I	1 019
SR-U- <i>Xho</i> I-R	CCGCTCGAGTAGATTTAGTAAACA ATCAA	1 487 294–1 487 313	<i>Xho</i> I	1 019
SR-D-attB1-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATTAG CACTTTTCCCAATG	1 483 778–1 483 797	attB1	2 038
SR-U-attB2-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGATT TAGTAAACAATCAA	1 487 294–1 487 313	attB2	2 038
<i>vraSR</i> -U-F	TGGTTCCGAAGCCTATTT	1 487 560–1 487 577		3 833
<i>vraSR</i> -D-R	CAGGTTTAGCAGCACAGA	1 483 745–1 483 762		3 833
Identification of <i>vraSR-srrAB</i> knockout mutant by RT-PCR				
qpcr- <i>srrA</i> -F	TGTTAGATTCCTTGTTG	1 101 960–1 101 977		197
qpcr- <i>srrA</i> -R	GAGCAGATGATTATATTGT	1 102 138–1 102 156		197
qpcr- <i>srrB</i> -F	GAAGGTGTTGAATAGGTT	1 100 407–1 100 424		172
qpcr- <i>srrB</i> -R	TCCATAGTAGACGGTATAG	1 100 506–1 100 520		172
qpcr- <i>vraSR</i> -F	GTTAAGGCACCATTGAATAAG	1 485 382–1 485 402		133
qpcr- <i>vraSR</i> -R	CTCACCTACTACTTCTATATCTCTC	1 485 270–1 485 293		133
<i>gyrB</i> -F	TAACAGCAGTCGTATCAA	2 610 741–2 610 758		148
<i>gyrB</i> -R	CCTACAGATGGATTCTCAT	2 610 611–2 610 629		148
Identification of transcription level of <i>icaA/icaR</i> gene in $\Delta$ <i>vraSR-srrAB</i> mutant by RT-qPCR				
<i>icaA</i> -F	GTATCAAGCGAAGTCAATC	2 334 779–2 334 797		130
<i>icaA</i> -R	ACAGCAATATCCTCAGTAAT	2 334 889–2 334 908		130
<i>icaR</i> -F	CCTTACATGATGAATTGATA	2 333 681–2 333 700		178
<i>icaR</i> -R	AGTGAATATACTTGGTCTT	2 333 523–2 333 541		178

F 表示正向引物, R 表示反向引物, 下划线表示酶切位点和 attB 位点

F indicates forward primer, R indicates reverse primer, and the underlined italics in the table indicate restriction sites and attB sites.

以 cDNA 为模板, qpcr-*srrA*-F/R、qpcr-*srrB*-F/R、qpcr-*vraSR*-F/R、qpcr-*gyrB*-F/R 为引物对进行 RT-PCR (表 1), 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 48 °C 10 s, 72 °C 1 min, 25 个循环; 72 °C 5 min。反应体系(25  $\mu$ L): 模板 cDNA (800 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, 超纯水 9.5  $\mu$ L。

### 1.2.5 表皮葡萄球菌生长曲线检测

挑取表皮葡萄球菌单个菌落接种于 TSB 培养基, 37 °C、220 r/min 培养过夜, 用 PBS 稀释

至  $OD_{600}$  为 1.0, 1:200 接种于 TSB 培养基, 不同温度(25、37、40 °C)条件下振荡(200 r/min)培养, 每 1 h 取样加于 96 孔培养板(200  $\mu$ L/孔, 3 复孔)中检测吸光度值( $OD_{600}$ ), 直至平台期(12 h)。

### 1.2.6 表皮葡萄球菌生物被膜形成半定量检测

采用微量平板半定量法检测表皮葡萄球菌生物被膜形成能力, 取 SE35984、 $\Delta$ *icaC*、SE1457、 $\Delta$ *vraSR*、 $\Delta$ *srrAB* 和  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 各菌株培养过夜后用 TSB 培养基(含 0.5%葡萄糖) 1:200 稀释后加于 96 孔培养板(200  $\mu$ L/孔, 3 复孔), 37 °C

静置孵育 6、12、24、48 h。弃上清后用 PBS 洗板, 甲醇固定 15 min, 2%结晶紫染色, 流水冲洗, 晾干后检测吸光度值( $OD_{570}$ )。

### 1.2.7 表皮葡萄球菌药物敏感性检测

根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)指南, 测定表皮葡萄球菌对万古霉素(vancomycin, Van)、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、卡那霉素(kanamycin, Kan)、氯霉素(chloroamphenicol, Cm)、环丙沙星(ciprofloxacin, Cip)的药物敏感性。菌株两次激活后接种于 TSB 培养基, 对数生长期菌液( $OD_{600}$  约为 0.6–0.8)调至 0.5 麦氏单位( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL), 以 1:200 接种于 2 mL 含不同药物(32  $\mu$ g/mL)的 MH 培养基, 35  $^{\circ}$ C 培养 16–20 h 观察结果, 设置空白对照和生长对照。

### 1.2.8 RT-qPCR 检测表皮葡萄球菌 *icaA/icaR* 基因转录水平

于 4  $^{\circ}$ C、4 000 $\times$ g 离心 10 min 收集对数生长期(6 h)菌体, 振荡破碎(4  $^{\circ}$ C)后抽提 RNA, 经 DNase I 处理后逆转录(HiScript III RT SuperMix)为 cDNA。使用 SYBR green 荧光染料进行定量 PCR, RT-qPCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 60 s, 95  $^{\circ}$ C 15 s。反应体系(20  $\mu$ L): 模板 cDNA (800 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L, ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu$ L, 无酶水 8.2  $\mu$ L。溶解曲线单一性峰值判断为扩增特异性。以 *gyrB* (DNA 解旋酶 B 亚单位)基因作为内参, 以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算相对表达量, 重复 3 次, 引物序列见表 1<sup>[18-19]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 pKOR1- $\Delta$ *vraSR* 的构建

以表皮葡萄球菌 SE1457 基因组为基础, 在 *vraSR* 基因上、下游约 1 kb 位置设计引物, 构

建同源序列, 在  $\Delta$ *srrAB* 突变株的基础上进一步敲除 *vraSR* 基因(图 1A)。PCR 扩增表皮葡萄球菌 SE1457 *vraSR* 基因的上游(up stream, US)和下游同源臂(down stream, DS), 大小均为 1 019 bp。US 和 DS 片段分别克隆至 pET28a 后获得重组质粒 pET28a-DS-US, 再以 SR-D-attB1-F/SR-U-attB2-R 为引物对 PCR 扩增获得 attB1-US-DS-attB2 片段(2 038 bp)。在 BP 克隆酶的作用下 attB1-US-DS-attB2 片段与 pKOR1 整合获得 pKOR1- $\Delta$ *vraSR* 重组质粒, 并经 PCR 和酶切鉴定(图 1B、1C)。

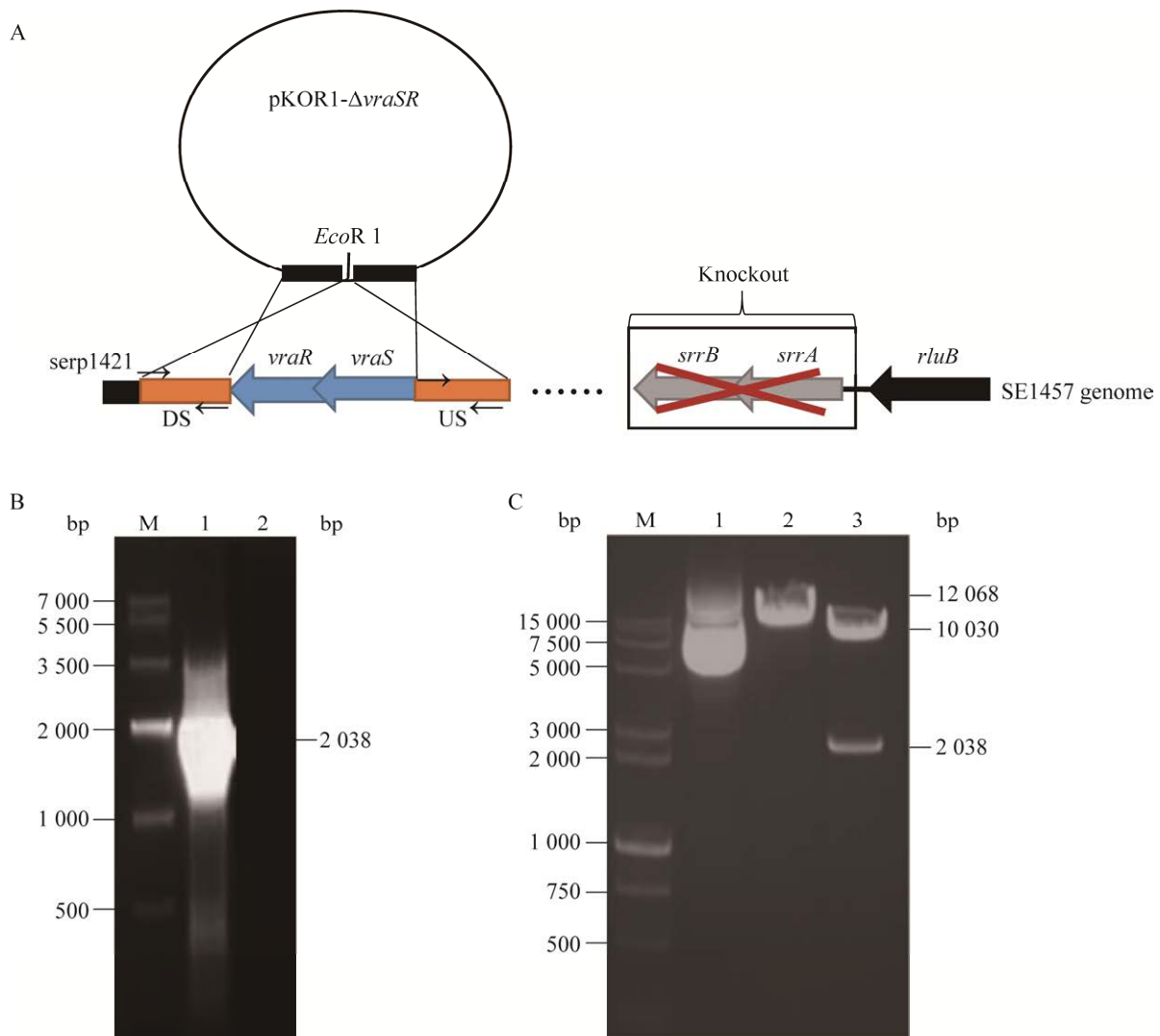
### 2.2 表皮葡萄球菌 $\Delta$ *vraSR-srrAB* 突变株的鉴定

分别以表皮葡萄球菌  $\Delta$ *srrAB* 及  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 突变株基因组 DNA 为模板, 在 *vraSR* 基因两侧设计引物(*vraSR*-U-F/*vraSR*-D-R)进行 PCR 扩增, 分别可见大小为 3 833 bp 和 2 156 bp 片段, 两者相差 1 677 bp (为敲除的 *vraSR* 基因长度)(图 2A)。测序证明 2 156 bp PCR 片段中无 *vraSR* 基因序列。上述结果表明在  $\Delta$ *srrAB* 突变株基础上敲除 *vraSR* 基因, 成功获得  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 突变株。

提取 SE1457、 $\Delta$ *vraSR*、 $\Delta$ *srrAB* 和  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 的 RNA 并逆转录为 cDNA 进行 RT-PCR 鉴定(引物序列见表 1), 以 *gyrB* 基因为内参。结果表明表皮葡萄球菌 SE1457 可正常转录 *vraSR* 和 *srrAB* 基因,  $\Delta$ *vraSR* 突变株中 *vraSR* 未见转录,  $\Delta$ *srrAB* 突变株中 *srrA* 和 *srrB* 未见转录, 而  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 突变株中 *srrA*、*srrB* 和 *vraSR* 均未见转录(图 2B)。

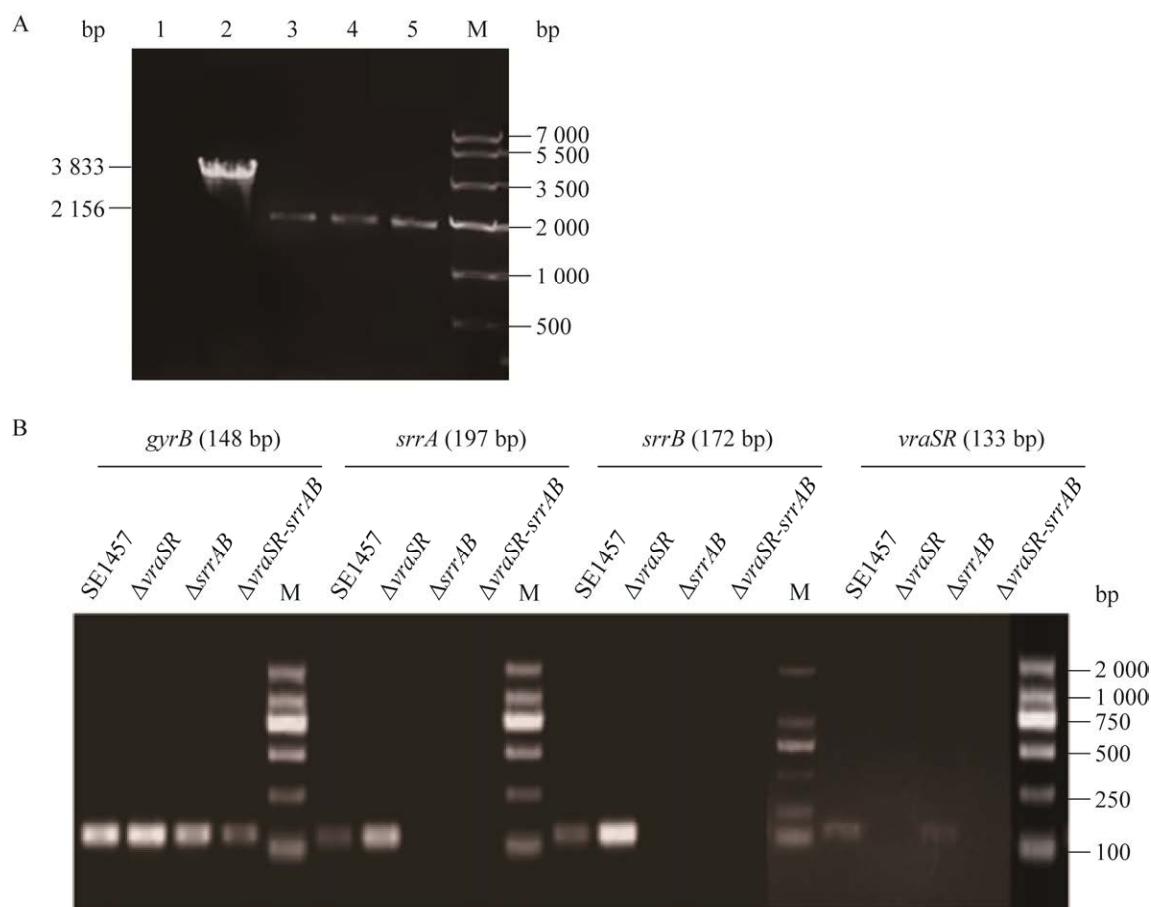
### 2.3 *vraSR-srrAB* 敲除降低表皮葡萄球菌的生长

在 25  $^{\circ}$ C 培养条件下, SE1457 生长到  $OD_{600}$  为 0.15 时需要 8 h,  $\Delta$ *vraSR* 与  $\Delta$ *srrAB* 生长到  $OD_{600}$  为 0.13 时需要大约 8 h, 而  $\Delta$ *vraSR-srrAB* 生长到  $OD_{600}$  为 0.15 时需要 11 h (图 3A)。在 37  $^{\circ}$ C 培



**图 1 重组质粒 pKOR1- $\Delta$ vraSR 构建和鉴定** A: 表皮葡萄球菌 SE1457 基因组, 箭头为引物位置; DS: 下游同源臂; US: 上游同源臂. B: pKOR1- $\Delta$ vraSR 重组质粒 PCR 鉴定, 分别以质粒 pKOR1- $\Delta$ vraSR (泳道 1)和 pKOR1 (泳道 2, 阴性对照) DNA 为模板, 以 SR-D-attB1-F/SR-U-attB2-R 为引物对进行 PCR 扩增, M: DL7000 DNA Marker. C: pKOR1- $\Delta$ vraSR 重组质粒酶切鉴定, M: DL15000 DNA Marker; 1: pKOR1- $\Delta$ vraSR 重组质粒(未加限制性内切酶); 2: pKOR1- $\Delta$ vraSR 重组质粒经 *Xho* I 酶切; 3: pKOR1- $\Delta$ vraSR 重组质粒经 *Xho* I/*Kpn* I 双酶切

Figure 1 Construction and identification of recombinant plasmid pKOR1- $\Delta$ vraSR. A: *Staphylococcus epidermidis* 1457 genome, arrows represent primer positions; DS: Down stream; US: Up stream. B: Identification of pKOR1- $\Delta$ vraSR recombinant plasmid by PCR using the primer pairs SR-D-attB1-F/SR-U-attB2-R; M: DL7000 DNA Marker; 1, 2: pKOR1- $\Delta$ vraSR and pKOR1 (negative control) plasmid DNA as templates, respectively. C: Identification of recombinant plasmid pKOR1- $\Delta$ vraSR using restriction enzyme digestion; M: DL15000 DNA Marker; 1: pKOR1- $\Delta$ vraSR recombinant plasmid (no restriction enzyme); 2: The recombinant plasmid pKOR1- $\Delta$ vraSR was digested with *Xho* I; 3: The recombinant plasmid pKOR1- $\Delta$ vraSR was digested with *Xho* I and *Kpn* I.



**图2** 表皮葡萄球菌  $\Delta v r a S R - s r r A B$  突变株的鉴定 A: 表皮葡萄球菌 SE1457  $\Delta v r a S R - s r r A B$  突变株 PCR 鉴定, M: DL7000 DNA Marker, 1: 蒸馏水为模板(空白对照); 2: SE1457  $\Delta s r r A B$  突变株基因组 DNA 为模板(阳性对照); 3-5: 疑似  $\Delta v r a S R - s r r A B$  突变株基因组 DNA 为模板. B: SE1457  $\Delta v r a S R - s r r A B$  突变株 RT-PCR 鉴定; 检测 SE1457 及其同源性  $\Delta v r a S R - s r r A B$  突变株中 *srrA* 基因、*srrB* 基因和 *vraSR* 基因的转录水平, *gyrB* 为看家基因; M: DL2000 DNA Marker

Figure 2 Verification of  $\Delta v r a S R - s r r A B$  mutant. A: PCR identification of  $\Delta v r a S R - s r r A B$  mutant; M: DL7000 DNA Marker; Lane 1 using distilled water as template (blank control); Lane 2 using  $\Delta s r r A B$  mutant genomic DNA as template (positive control); Lanes 3-5 using genomic DNA of the suspected  $\Delta v r a S R - s r r A B$  mutant strains as template. B: Identification of  $\Delta v r a S R - s r r A B$  mutant by RT-PCR, transcriptional levels of *srrA*, *srrB* and *vraSR* were detected, *gyrB* was designated as house-keeping gene. M: DL2000 DNA Marker.

养条件下, SE1457 生长到  $OD_{600}$  为 0.65 时需要 5 h,  $\Delta v r a S R$  与  $\Delta s r r A B$  生长到  $OD_{600}$  为 0.7 需要大约 5.5 h, 而  $\Delta v r a S R - s r r A B$  生长到  $OD_{600}$  为 0.7 则需要 9 h (图 3B)。在 40 °C 培养条件下, SE1457 与  $\Delta v r a S R$  接种后约 7 h 进入平台期,  $\Delta s r r A B$  需要 8 h, 而  $\Delta v r a S R - s r r A B$  接种后约 12 h 后进入平

台期(图 3C)。

#### 2.4 *vraSR-srrAB* 敲除增强表皮葡萄球菌的药物敏感性

采用试管稀释法测定表皮葡萄球菌的药物敏感性(表 2)。与 SE1457 相比,  $\Delta v r a S R$  或  $\Delta s r r A B$  突变株对万古霉素、氨苄青霉素的敏感性均显



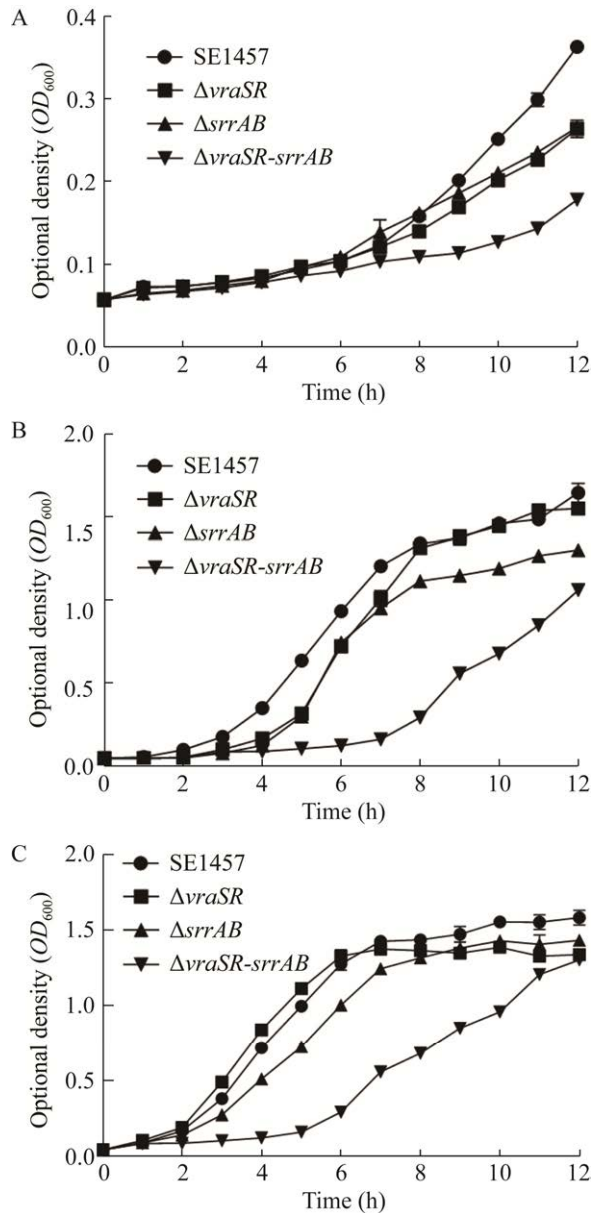


图3 表皮葡萄球菌SE1457及其同源性突变株生长曲线

Figure 3 Growth curve of SE1457 and its isogenic mutants. A: 25 °C. B: 37 °C. C: 40 °C.

著增强(约 2–8 倍), 而对卡那霉素、氯霉素和环丙沙星的药物敏感性无明显差异; 与  $\Delta vraSR$  或  $\Delta srrAB$  突变株相比,  $\Delta vraSR-srrAB$  突变株对上述抗生素的药物敏感性无明显差异, 较 SE1457 药物敏感性显著增强。

表2 表皮葡萄球菌SE1457及其同源性突变株的药物敏感性分析

Table 2 Susceptibility of SE1457 and its isogenic mutants

Strains	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )				
	Van	Amp	Kan	Cm	Cip
SE1457	4	0.40	1.60	8	0.25
$\Delta vraSR$	0.50–1.00	0.10–0.20	1.60	8	0.25
$\Delta srrAB$	2	0.20	1.60	4	0.25–0.50
$\Delta vraSR-srrAB$	2	0.05	1.60	4	0.25

Van: 万古霉素; Amp: 氨苄青霉素; Kan: 卡那霉素; Cm: 氯霉素; Cip: 环丙沙星

Van: Vancomycin; Amp: Ampicillin; Kan: Kanamycin; Cm: Chloroamphenicol; Cip: Ciprofloxacin.

## 2.5 $vraSR-srrAB$ 敲除协同调控表皮葡萄球菌生物被膜的形成

微量平板定量法检测表皮葡萄球菌生物被膜形成能力, SE1457 野生株在孔底形成致密的生物被膜结构, 与阳性对照 SE35984 生物被膜形成量相似;  $\Delta vraSR$  和  $\Delta srrAB$  突变株生物被膜形成能力显著降低,  $\Delta vraSR-srrAB$  突变株与阴性对照  $\Delta icaC$  相似, 几乎不形成生物被膜(图 4A)。结晶紫染色后进行定量( $OD_{570}$ )分析,  $\Delta vraSR$  生物被膜形成量是 SE1457 野生株的 40%–60%,  $\Delta srrAB$  突变株为 SE1457 的 20%–30%, 而  $\Delta vraSR-srrAB$  突变株低于 SE1457 野生株的 10% (图 4B)。

## 2.6 表皮葡萄球菌 $\Delta vraSR-srrAB$ 突变株改变 $icaA/icaR$ 基因的转录水平

RT-qPCR 检测 SE1457 及其同源性突变株中  $icaA$  和  $icaR$  基因的转录水平, 结果表明与 SE1457 相比,  $\Delta vraSR$  和  $\Delta srrAB$  单一突变株中  $icaA$  转录水平分别下调 17% 和 13%, 而  $\Delta vraSR-srrAB$  双突变株  $icaA$  转录水平下调 6%; 另外,  $\Delta vraSR$  和  $\Delta srrAB$  突变株中  $icaR$  转录水平分别上调 9.1 倍和 5.2 倍, 而  $\Delta vraSR-srrAB$  突变株  $icaR$  转录水平上调 14.1 倍(图 5)。

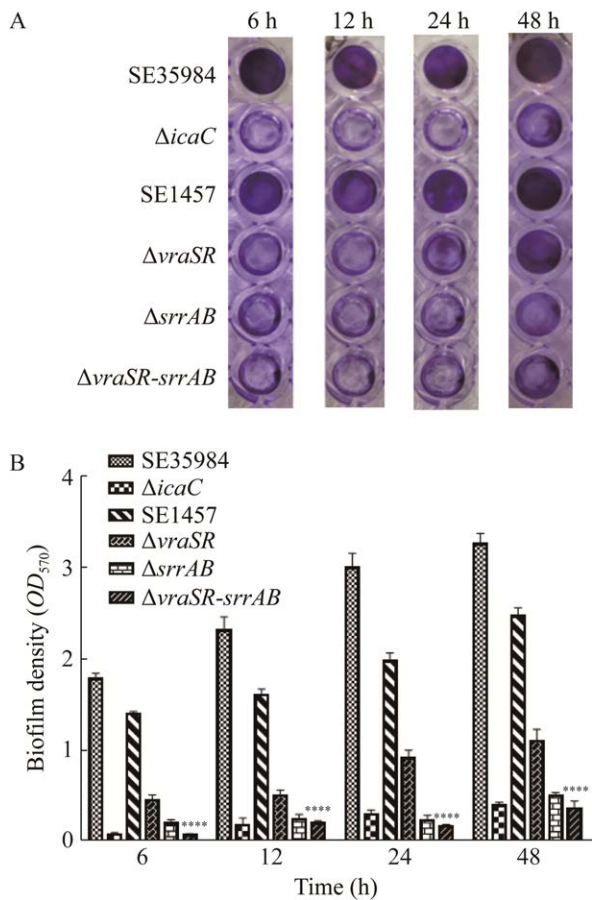


图 4 敲除 *vraSR-srrAB* 对表皮葡萄球菌生物被膜形成的影响 A: PBS 清洗后结晶紫染色观察。B: 吸光度值( $OD_{570}$ )

Figure 4 Effect of *vraSR-srrAB* deletion on the biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. A: After washing with PBS, the results of crystal violet staining were observed. B: Optical density ( $OD_{570}$ ).

### 3 讨论与结论

基因敲除是研究基因功能最常用且可靠的方法之一<sup>[20]</sup>。本文选用同源重组发生概率高、突变株筛选效率高、筛选程序简单的质粒 pKOR1<sup>[21]</sup>, 采用 Gateway 克隆技术构建同源重组质粒并结合大肠杆菌 DC10B 修饰菌株高效易获取的特点<sup>[22-23]</sup>, 首次获得两组 TCS 同时缺失的表皮葡萄球菌  $\Delta vraSR-srrAB$  突变株。

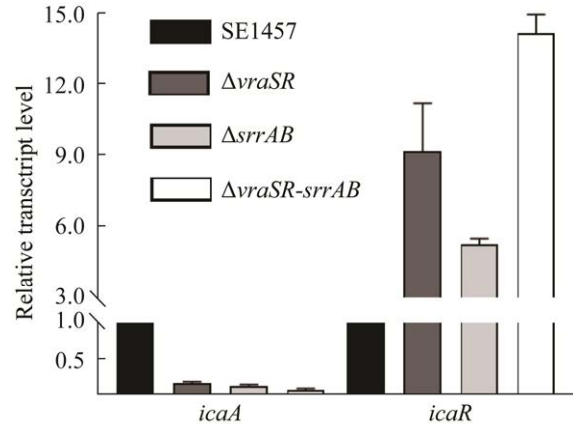


图 5 表皮葡萄球菌  $\Delta vraSR-srrAB$  突变株 *icaA/icaR* 基因的转录水平情况 通过 RT-qPCR 检测 *icaA* 和 *icaR* 转录水平, 以 *gyrB* 为内参, 采用相对定量 ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) 检测目的基因的转录水平差异, 重复 3 次, 以平均值±标准差表示

Figure 5 Transcription levels of *icaA/icaR* gene in  $\Delta vraSR-srrAB$  mutant. The transcription levels of *icaA* and *icaR* were detected by RT-qPCR using *gyrB* as the internal reference, relative quantification ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) was used to detect the differences in transcription levels of target genes, data represented the mean±standard deviation from three independent experiments.

通过菌株生长曲线测定发现, 表皮葡萄球菌 SE1457 $\Delta vraSR-srrAB$  突变株相较于其他菌株生长明显滞后, 尤其在高温(40 °C)和低温(25 °C)条件下更为明显。前期研究发现, SrrAB 通过调控呼吸代谢相关基因的转录而影响表皮葡萄球菌的生长<sup>[11]</sup>, 而 VraSR 与表皮葡萄球菌的生长无直接关系, 可能通过调控糖和氨基酸代谢影响细胞壁的合成, 进而增强表皮葡萄球菌的耐药性和对环境压力的耐受性<sup>[9]</sup>。 $\Delta vraSR-srrAB$  突变株较  $\Delta vraSR$  和  $\Delta srrAB$  单一突变株生长更为迟缓, 对温度压力(高温或低温)较为敏感。这可能与 VraSR 与 SrrAB 的协同作用有关, 两组 TCS 同时缺失导致表皮葡萄球菌应对压力应激能力下降, 改变的生物学表型相互叠加。此外,

进一步选用 5 种不同作用机制的抗生素测定  $\Delta vraSR-srrAB$  突变株对环境中的抗生素压力的应激能力, 结果表明  $\Delta vraSR-srrAB$  突变株对氨苄青霉素和万古霉素的敏感性较 SE1457 野生株、 $\Delta vraSR$  或  $\Delta srrAB$  单一突变株显著提高, 而对氯霉素、卡那霉素和环丙沙星的敏感性无显著差异, 提示  $VraSR$  和  $SrrAB$  可能在表皮葡萄球菌应对靶向细胞壁的压力应激作用中发挥一定的协同作用, 具体机制有待进一步研究。

细胞间多糖黏附素(polysaccharide intercellular adhesion, PIA)是表皮葡萄球菌生物被膜基质的重要成分, 在 PIA 介导下生物被膜细胞聚集成熟, 形成细菌生长的巢穴<sup>[24]</sup>。PIA 的合成、转运和修饰均依赖 *ica* 操作子的表达产物。*icaADBC* 的编码产物 IcaADBC 在 PIA 的合成、转移及修饰中发挥重要作用, 而 IcaR 则抑制 *ica* 操作子的转录, 使 PIA 合成减少<sup>[25-26]</sup>。前期研究发现<sup>[9,11]</sup>, TCS- $VraSR$  和  $SrrAB$  均通过 *ica* 途径调控表皮葡萄球菌生物被膜的形成, 单一敲除 *vraSR* 或 *srrAB* 基因均不能完全控制表皮葡萄球菌生物被膜的形成。同时对  $\Delta vraSR$  突变株和  $\Delta srrAB$  突变株分别做了 *vraSR* 和 *srrAB* 基因的回补, 明确了 TCS- $VraSR$  和  $SrrAB$  分别在表皮葡萄球菌单基因敲除后对其生物被膜形成的作用<sup>[9,11]</sup>。而同时敲除 *vraSR* 和 *srrAB* 对表皮葡萄球菌 *ica* 操作子的影响强于单一敲除一组 TCS,  $\Delta vraSR-srrAB$  突变株几乎不能形成生物被膜, 提示 TCS- $VraSR$  与  $SrrAB$  在调控表皮葡萄球菌生物被膜形成中存在协同作用。为排除生长对生物被膜形成的影响, 我们延长生物被膜检测的时间, 在培养 48 h 后 SE1457 野生株、 $\Delta vraSR$  突变株、 $\Delta srrAB$  突变株和  $\Delta vraSR-srrAB$  突变株上清中菌液浓度( $OD_{600}$  值)相近,  $\Delta vraSR-srrAB$  突变株生物被膜形成量仍与  $\Delta icaC$  突变株类似, 几乎不形成生物被膜, 提示  $VraSR$  和  $SrrAB$

并非通过调控表皮葡萄球菌的生长而影响生物被膜的形成。此外, TCS- $VraSR$  和  $SrrAB$  是否还通过非 *ica* 途径协同调控表皮葡萄球菌生物被膜的形成有待进一步研究。

本文选取两组关键 TCS 来探索其在表皮葡萄球菌生长及生物被膜形成中的作用, 初步发现针对两组具有协同作用的 TCS 是控制表皮葡萄球菌生物被膜形成有效的措施, 在控制生物被膜形成的同时给予抗生素治疗可能效果更佳, 此结果对研发抗葡萄球菌生物被膜药靶具有一定指导意义。

## REFERENCES

- [1] CONLON BP. *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: evidence of a role for persister cells: an investigation of persister cells, their formation and their role in *S. aureus* disease[J]. BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, 2014, 36(10): 991-996.
- [2] BLANCO-CABRA N, LÓPEZ-MARTÍNEZ MJ, ARÉVALO-JAIMES BV, TERESA MARTIN-GÓMEZ M, SAMITIER J, TORRENTS E. A new BiofilmChip device for testing biofilm formation and antibiotic susceptibility[J]. NPJ Biofilms and Microbiomes, 2021, 7: 62.
- [3] OLWAL CO, ANG'IENDA PO, ONYANGO DM, OCHIEL DO. Susceptibility patterns and the role of extracellular DNA in *Staphylococcus epidermidis* biofilm resistance to physico-chemical stress exposure[J]. BMC Microbiology, 2018, 18(1): 40.
- [4] ALTAYB HN, ELBADAWI HS, BAOTHMAN O, KAZMI I, ALZHRANI FA, NADEEM MS, HOSAWI S, CHAIEB K. Whole-genome sequence of multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* carrying biofilm-associated genes and a unique composite of SCCmec[J]. Antibiotics (Basel, Switzerland), 2022, 11(7): 861.
- [5] PEI S, MORONE F, LILJEROS F, MAKSE H, SHAMAN JL. Inference and control of the nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. eLife, 2018, 7: e40977.
- [6] WEINER LM, WEBB AK, LIMBAGO B, DUDECK MA, PATEL J, KALLEN AJ, EDWARDS JR, SIEVERT DM. Antimicrobial-resistant pathogens

- associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2011–2014[J]. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2016, 37(11): 1288-1301.
- [7] JENUL C, HORSWILL AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018.
- [8] TIERNEY AR, RATHER PN. Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance[J]. *Future Microbiology*, 2019, 14(6): 533-552.
- [9] WU YC, MENG YY, QIAN L, DING BX, HAN HY, CHEN HL, BAI L, QU D, WU Y. The vancomycin resistance-associated regulatory system *VraSR* modulates biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* in an *ica*-dependent manner[J]. *mSphere*, 2021, 6(5): e0064121.
- [10] 乾莲, 陈红玲, 孟媛媛, 陈晓婷, 孙士正, 武有聪. 表皮葡萄球菌 *VraSR* 生物信息学分析及 *VraR* 蛋白的原核表达[J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(10): 1158-1162.
- QIAN L, CHEN HL, MENG YY, CHEN XT, SUN SZ, WU YC. Bioinformatic analysis of *VraSR* and prokaryotic expression of *VraR* in *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2021, 16(10): 1158-1162 (in Chinese).
- [11] WU YC, WU Y, ZHU T, HAN HY, LIU HY, XU T, FRANCOIS P, FISCHER A, BAI L, GÖTZ F, QU D. *Staphylococcus epidermidis* *SrrAB* regulates bacterial growth and biofilm formation differently under oxic and microaerobic conditions[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(3): 459-476.
- [12] 孟媛媛, 乾莲, 郭姝蓉, 武有聪, 瞿涤. *SrrAB* 在葡萄球菌生长代谢及存活中的作用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(02): 596-605.
- MENG YY, QIAN L, GUO SR, WU YC, QU D. Role of *SrrAB* in the growth, metabolism and viability of *Staphylococcus*: a review[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(02): 596-605 (in Chinese).
- [13] 武有聪, 许涛, 刘华勇, 韩海燕, 吴旻, 白丽, 瞿涤. 葡萄球菌呼吸相关双组分系统 *SrrAB* 研究进展[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(12): 1796-1807.
- WU YC, XU T, LIU HY, HAN HY, WU Y, BAI L, QU D. Advances in two-component signal transduction system *SrrAB* of *Staphylococcus*[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(12): 1796-1807 (in Chinese).
- [14] 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-e00518.
- [15] DOUGLASS WRIGHT W, SHAH SS, HEYER WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(27): 10524-10535.
- [16] HOQUE J, KONAI MM, GONUGUNTLA S, MANJUNATH GB, SAMADDAR S, YARLAGADDA V, HALDAR J. Membrane active small molecules show selective broad spectrum antibacterial activity with no detectable resistance and eradicate biofilms[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 58(14): 5486-5500.
- [17] 朱涛, 段芹, 李朝品, 瞿涤. 一种高效的葡萄球菌基因敲除方法的建立与应用[J]. *中国人兽共患病学报*, 2015, 31(12): 1098-1102.
- ZHU T, DUAN Q, LI CP, QU D. Establishment and application of a rapid and efficient method for gene replacement in *Staphylococci*[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2015, 31(12): 1098-1102 (in Chinese).
- [18] MA HY, BELL KN, LOKER RN. qPCR and qRT-PCR analysis: regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies[J]. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 2021, 20: 152-168.
- [19] 朱娟, 陈丽华, 余鹏飞, 谭芮辰, 王妍乐, 伍勇. 表皮葡萄球菌临床菌株 *icaA*、*icaR* 基因与生物被膜形成关系的研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38(6): 619-623.
- ZHU J, CHEN LH, SHE PF, TAN RC, WANG YL, WU Y. Research on the correlations between *icaA* and *icaR* genes with biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Journal of Hunan University of Chinese Medicine*, 2018, 38(6): 619-623 (in Chinese).
- [20] ITO T, YOUNG MJ, LI RT, JAIN S, WERNITZNIG A, KRILL-BURGER JM, LEMKE CT, MONDUCCI D, RODRIGUEZ DJ, CHANG L, DUTTA S, PAL D, PAOLELLA BR, ROTHBERG MV, ROOT DE, JOHANNESSEN CM, PARIDA L, GETZ G, VAZQUEZ F, DOENCH JG, ZAMANIGHOMI M, SELLERS WR. Paralog knockout profiling identifies *DUSP4* and *DUSP6* as a digenic dependence in MAPK pathway-driven cancers[J]. *Nature Genetics*, 2021, 53(12): 1664-1672.
- [21] LOU Q, ZHU T, HU J, BEN HJ, YANG JS, YU FY, LIU JR, WU Y, FISCHER A, FRANCOIS P, SCHRENZEL J, QU D. Role of the *SacRS*

- two-component regulatory system in *Staphylococcus epidermidis* autolysis and biofilm formation[J]. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 146.
- [22] 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.
- 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).
- [23] COSTA SK, DONEGAN NP, CORVAGLIA AR, FRANÇOIS P, CHEUNG AL. Bypassing the restriction system to improve transformation of *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(16): e00271-e00217.
- [24] VUONG C, VOYICH JM, FISCHER ER, BRAUGHTON KR, WHITNEY AR, DeLEO FR, OTTO M. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system[J]. *Cellular Microbiology*, 2004, 6(3): 269-275.
- [25] OUFRID S, GHAZLANE Z, JAMALI L, EL OTMANI F, TALMI M, ELMDAGHRI N, ZEROUALI K, TIMINOUNI M. Correlation between staphylococcal biofilm formation *in vitro* and potential for catheter-related infections[J]. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2015, 9(4): 368-372.
- [26] SWOLANA D, KĘPA M, KRUSZNIEWSKA-RAJS C, WOJTYCZKA RD. Antibiofilm effect of silver nanoparticles in changing the biofilm-related gene expression of *Staphylococcus epidermidis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(16): 9257.