

DOI:10.13350/j.cjpb.221101

• 论著 •

表皮葡萄球菌 SE1457 与 *vraSR* 突变株 转录组测序比较分析*

孙士正,孟媛媛,张维娜,刁德睿,陈晓婷,武有聪**

(大理大学基础医学院病原生物学综合实验室,云南大理 671000)

【摘要】 目的 筛选和验证 *VraSR* 调控的下游靶基因,为表皮葡萄球菌 *vraSR* 生物学功能研究提供参考。方法 在加与未加万古霉素(Van+/Van-)两种条件下,抽提表皮葡萄球菌 SE1457 及其同源性 *vraSR* 突变株 RNA,构建 cDNA 文库(每个菌株 3 个独立样品),采用 Illumina HiSeq 进行转录组测序,差异表达基因筛选标准为 Q value<0.05,且表达值变化倍数 FC \geq 2(FDR 校正 $P<0.05$, t 检验),对差异表达基因进行 GO 及 KEGG 分析,并进行 qRT-PCR 验证。

结果 与 SE1457 野生株相比,Van+条件下 *vraSR* 突变株有 39 个差异表达基因(16 个下调,23 个上调),Van-条件下 *vraSR* 突变株有 61 个差异表达基因(35 个下调,26 个上调),差异表达基因主要涉及糖代谢、磷酸戊糖途径、三羧酸循环等。Van+/Van- 2 种条件下 qRT-PCR 检测生物膜形成相关基因 *icaA* 相对表达量分别为 0.44 ± 0.06 和 0.17 ± 0.05 ($P<0.01$),*icaR* 为 4.35 ± 0.79 ($P<0.01$) 和 9.27 ± 4.4 ($P<0.05$),未发现耐药相关基因(*pbp2*,*sgtB*,*murZ*)转录水平改变($P>0.05$)。结论 表皮葡萄球菌 *VraSR* 可能通过 *ica* 途径调控生物膜形成,并通过调节肽聚糖合成相关基因的转录间接影响耐药性。

【关键词】 万古霉素耐药相关双组分系统;转录组测序分析;表皮葡萄球菌

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)11-1241-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Nov. ;17(11):1241-1246.]

Comparison analysis on the transcriptome sequencing of *Staphylococcus epidermidis* SE1457 and its isogenic *vraSR* mutant strain

SUN Shi-zheng, MENG Yuan-yuan, ZHANG Wei-na, DIAO De-rui, CEHNG Xiao-ting, WU You-cong

(Integrated Lab of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the target genes regulated by *VraSR* and provide the reference for the biological function study of *VraSR* in *Staphylococcus epidermidis*. **Methods** The RNA samples of *S. epidermidis* SE1457 and its allelic *vraSR* mutant cultured with or without vancomycin (Van+/Van-) were extracted, and the cDNA library was constructed. Transcriptomic sequencing was performed by Illumina Hi Seq system. The screening criteria for differentially expressed genes (DEGs) were Q value < 0.05, and transcriptional level more than 2 folds (FDR correction $P<0.05$, T test). DEGs were analyzed using GO and KEGG enrichment analysis, and verified using qRT-PCR. **Results** Compared with those in SE1457 parent strain, 39 DEGs (16 down-regulated genes, 23 up-regulated genes) were found in the *vraSR* deletion mutant under Van+ condition, whereas 61 DEGs (35 down-regulated genes, 26 up-regulated genes) under Van- condition, these DEGs were mainly involved in glucose metabolism, pentose phosphate pathway, tricarboxylic acid cycle, etc. The results of qRT-PCR under both Van+/Van- conditions further indicated that the relative expression of *icaA* was 0.44 ± 0.06 and 0.17 ± 0.05 ($P<0.01$), respectively, and *icaR* was 4.35 ± 0.79 ($P<0.01$) and 9.27 ± 4.4 ($P<0.05$). However, the transcriptional levels of the drug-resistance related genes such as *pbp2*, *sgtB*, and *murZ* showed no significant changes ($P>0.05$). **Conclusion** *S. epidermidis* *VraSR* may regulate biofilm formation through *ica* pathway, and it also indirectly affect drug resistance by regulating the transcription of genes related to peptidoglycan synthesis.

【Key words】 Vancomycin resistance associated sensor/regulator; transcriptome sequencing analysis; *Staphylococcus epidermidis* ***

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82060380;81660346);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(No. FD-MV-2021002)。

** **【通讯作者】** 武有聪, E-mail: youcongwu@163.com

【作者简介】 孙士正(1997-),男,湖南邵阳人,在读硕士研究生。主要研究方向:细菌持续性感染与耐药。E-mail:453912291@qq.com

葡萄球菌属(*Staphylococcus*)作为引起医院感染的重要病原菌之一,一直是临床上关注的焦点,主要致病菌种有金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)^[1]和表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)。金黄色葡萄球菌主要通过分泌多种外毒素而致病^[2],表皮葡萄球菌主要通过医疗器械表面形成生物膜而引起持续性感染^[3]。双组分信号转导系统(two-component signal transduction system, TCS)^[4]广泛存在于原核细胞型微生物中,能够感应细菌所处环境压力的变化,调控菌体内相关基因的表达。TCS核心是由反应调节蛋白(response regulator, RR)和组氨酸蛋白激酶(histidine kinase, HK)两个基本组分组成, HK一般为跨膜蛋白(感受器, sensor),通过自身磷酸化的形式将外界信号变化传递至胞内,使反应调节蛋白 RR(DNA-binding regulator)磷酸化后发生构象改变,暴露出 DNA 结合位点,以调控下游靶基因的转录^[5],参与调控细菌的多种生物学功能,如生长代谢、细胞壁合成、毒力、耐药及生物膜形成等^[6]。

葡萄球菌万古霉素耐药相关双组分系统 VraSR (vancomycin resistance-associated regulatory system)主要通过感应细胞壁的压力变化(如万古霉素的作用等)激活耐药基因表达,从而调控细菌的耐药表型、毒力及生物膜的形成等^[7]。本研究前期通过同源重组敲除表皮葡萄球菌 SE1457 的 *vraSR* 基因后发现, Δ *vraSR* 突变株生物膜形成量显著降低,细胞壁变薄,抵抗环境胁迫因子的能力降低等,提示表皮葡萄球菌 TCS-VraSR 的生物学功能不同于金黄色葡萄球菌。为进一步分析表皮葡萄球菌 TCS-VraSR 调控的下游靶基因,在加入和未加万古霉素两种压力条件下(Van+/Van-)抽取 RNA,通过转录组测序(RNA seq)比较分析表皮葡萄球菌 SE1457 及 Δ *vraSR* 突变株的差异表达基因,并对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 聚类分析,为研究表皮葡萄球菌 VraSR 生物学功能提供线索。

材料与方法

1 菌株及参考基因组

表皮葡萄球菌 SE1457 及其同源性 *vraSR* 敲除突变株(Δ *vraSR*)由本实验室保存。表皮葡萄球菌参考基因组: *S. epidermidis* RP62A (GenBank: CP000029.1), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP000029.1>, 转录组测序后以参照表皮葡萄球菌 RP62A 标准株基因组进行标注。

2 RNA 样品处理

表皮葡萄球菌 SE1457 和 Δ *vraSR* 转种激活后接种于 TSB(Trypticase Soy Broth)培养基, 37 °C、200

r/min 摇菌培养过夜;按 1:100 稀释至 TSB 培养基中,震荡培养 5.5 h;加入万古霉素(1/10 MIC 浓度, Van+),同时设置不加万古霉素对照组(Van-),继续培养 30 min 后收菌,0.9% NaCl 洗涤 2 次(6 000 r/min);加入 0.1 mm Ziconia-silica bead,在全自动匀浆仪(Mini-Beadbeater, Bio-Rad)上进行细菌破碎(4 000 r/min, 40 s/次),共 5 次,期间冰浴间隔 1 min;14 000 r/min 离心 2 min,取上清,采用 RNeasy-mini kit(Qiagen)提取 RNA,用酚:氯仿:异戊醇和无水乙醇沉淀 RNA。每个样品做 3 个独立重复,提取的 RNA 干冰保存。

3 转录组测序差异表达基因筛选

采用 Illumina HiSeq 测序平台完成细菌的转录组测序,构建 Illumina PE 文库进行 2×150 bp 测序。对测序的原始数据进行优化,获得高质量 clean reads。使用 BlastX 分别与 NR、String、Swissprot、KEGG、CARD、CAZY 数据库进行比对,获得相应的注释信息。使用 edgeR 进行样品间的差异基因分析,差异倍数(Fold Change, FC)表示两样品(组)间表达量的比值,筛选标准为 $|\log_2FC| > 1$,且 $P \leq 0.05$;通过对差异有统计学意义的 P 值进行多重检验校正错误发现率(False Discovery Rate, FDR)。分别在 GO 及 KEGG 数据库中进行差异表达基因富集,分析其参与的生化代谢途径和信号转导途径。

4 差异表达基因的验证

在 Van+/Van-两种条件下抽提表皮葡萄球菌 SE1457 与 Δ *vraSR* 突变株总 RNA, DNase I 处理后逆转录为 cDNA (iScript reverse transcriptase, Bio-Rad)。用 SYBR green 试剂(Premix Ex Taq, TaKaRa)进行定量 PCR(qPCR)。扩增条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 5 s, 60 °C 34 s,共 40 个循环。融解曲线单一性峰值判断为特异性扩增。*gyrB* (DNA gyrase subunit B)基因为内参基因,目的基因的转录水平用相对定量法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)表示。试验重复 3 次。采用 Beacon Designer 软件(Premier Biosoft)设计引物,引物序列见表 1。结果用 SPSS 软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1 Van-条件下 Δ *vraSR* 突变株与 SE1457 野生株转录组分析

在无万古霉素压力条件(Van-)下, Δ *vraSR* 突变体与 SE1457 野生株转录组比较有 61 个差异表达基因,其中 35 个基因转录水平下调,26 个基因转录水平上调(表 2)。转录水平下调的基因主要参与糖酵解和糖异生(*serp2112*、*pgk*),磷酸戊糖途径(*serp2381*、

sdhA、*purN*)、生物膜形成(*pflA*、*pflB*)、嘧啶代谢(*nrdD*)、氨基酸合成(*gltD*)、丙酮酸代谢(*pflD*)、丁酸代谢(*serp2257*)等;转录水平上调的基因中存在编码参与功能尚不清楚的假定蛋白。

表1 qRT-PCR 验证引物
Table 1 qPCR primer sequences

引物名称 Primer	引物序列 Sequence(5'-3')	产物长度 Product size(bp)
lrgA-F	TCAACAAGCATTAACGAT	194
lrgA-R	GTACGAATAGGAATCCAATA	194
cidA-F	TATAGGCACAGAAGTTCA	189
cidA-R	GCAACATCCATAAATTCCT	189
icaR-F	CCTTACATGATGAATTGATA	178
icaR-R	AGTGAATATACTTGGTCTT	178
icaA-F	GTATCAAGCGAAGTCAATC	130
icaA-R	ACAGCAATATCCTCAGTAAT	130
serp1412-F	AGTACAATTACGCAACAAGT	185
serp1412-R	GCAGCACCTTCTACAGTA	185
gntK-F	TTGATTGTTATGAACGAGAA	159
gntK-R	AGATAATGGTGACATAGGAT	159
glpD-F	TTGATGAAGTGAGAAGTG	185
glpD-R	AGTTGTTCTACATAAGC	185
fruK-F	GTTGATTCTACAGCCTTAG	112
fruK-R	GCGTATCCTCATCTACTT	112
sdhA-F	CCAGAACAATCAGGACAT	111
sdhA-R	AATAGCATTACGCATTACAC	111
serp2114-F	GCGATAGGATTGGAGTCT	121
serp2114-R	CTTGTTACTGGTTCATCA	121
serp1909-F	GTCCAGTAGTTGTTAATCAT	156
serp1909-R	TTGCCAATGCTATACCTA	156
gyrB-F	TAACAGCAGTCGTATCAA	148
gyrB-R	CCTACAGATGGATTCTCAT	148
gltD-F	ATGTGGTGCATAATCAA	134
gltD-R	AATGACGGAAGAGTAGGA	134
serp2380-F	CACCAACACGAATCATT	156
serp2380-R	GAACAACATTAGCCAACT	156
serp2381-F	AACAGCCTGAAGAGATTA	162
serp2380-R	TTCTTAACCTCGTCAACAT	162
pbp2-F	AAGAATGAAGACCAACAA	142
pbp2-R	TTAATGATGAACCAGTAGG	142
murE-F	GTATTACTACGAAGCACAA	154
murE-R	GCAATCATAGCAGCCATAA	154
murAA-F	ATATGTCACCACGAGTTAT	121
murAA-R	ACTGATACCATTACGATACA	121
sigB-F	GTAATGAGGTCGTTGAGA	184
sigB-R	GTCTTAGAACTATTGCTACAC	184

2 Van+条件下 ΔvraSR 突变株与 SE1457 野生株转录组分析

在万古霉素压力条件下(Van+), Δ vraSR 突变株与 SE1457 野生株转录组比较有 39 个差异表达基因,其中 16 个基因转录水平下调,23 个基因转录水平上调(表 2)。转录水平下调的基因主要参与柠檬酸循环(*serp2381*)、糖酵解与糖异生(*gdh*、*galU*、*gntK*)、氨基酸合成(*gltD*)、氮代谢(*narG*、*narZ*)等;转录水平上调的基因主要参与核黄素代谢(*ribA*、*ribD*、*ribH*、

ribAB)、蛋白质合成(*rpsJ*、*rpsF*)等。

3 Van+与 Van-压力条件下差异表达基因的比较

在 Van+和 Van-两种条件下有 6 个差异表达基因(*vraS*、*vraR*、*SERP0224*、*gltD*、*SERP2381*、*SERP2380*)显著下调,*SERP0224* 编码一种保守的假定蛋白,*gltD* 编码谷氨酸合成酶亚基,*SERP2381* 编码延胡索酸还原酶黄素蛋白亚基,*SERP2380* 编码一种药物转运蛋白。在上述两种条件下 Δ vraSR 突变株与 SE1457 野生株相比,耐药直接相关基因 *pbp2*、*sgtB* 和 *murZ* 等的转录水平均无显著改变。

4 ΔvraSR 突变株与 SE1457 野生株差异表达基因的验证

结合 Δ vraSR 突变株的生物学表型,采用 qRT-PCR 对部分差异表达基因进行验证(表 2)。结果显示,在 Van+条件下与 SE1457 野生株相比, Δ vraSR 突变株中与生物膜形成相关基因 *icaA* 相对表达量为 0.44 ± 0.06 ($P < 0.01$)、*icaR* 为 4.35 ± 0.79 ($P < 0.01$);与细胞程序性死亡相关基因 *lrgA* 相对表达量为 0.13 ± 0.08 ($P < 0.01$)、*cidA* 为 3.60 ± 1.54 ($P < 0.05$);糖代谢相关基因 *gntK* 相对表达量为 0.10 ± 0.08 ($P < 0.01$)、*glpD* 为 0.50 ± 0.23 ($P < 0.05$);与磷酸戊糖途径相关基因 *sdhA* 相对表达量为 2.02 ± 0.49 ($P < 0.05$);*gltD*、*serp2380*、*serp2381* 基因相对表达量分别为 0.26 ± 0.09 、 0.26 ± 0.09 、 0.23 ± 0.11 ($P < 0.01$)。在 Van-条件下与 SE1457 相比, Δ vraSR 突变株中 *icaA* 相对表达量为 0.17 ± 0.05 ($P < 0.01$)、*icaR* 为 9.27 ± 4.4 ($P < 0.05$);*lrgA* 为 0.10 ± 0.11 ($P < 0.01$)、*cidA* 4.60 ± 0.46 ($P < 0.01$);*gltD*、*serp2380*、*serp2381* 基因相对表达量分别为 0.44 ± 0.37 、 0.37 ± 0.12 、 0.17 ± 0.08 ($P < 0.01$)。葡萄球菌耐药相关基因如青霉素结合蛋白基因(*pbp2*)、糖基转移酶基因(*stgB*)、UDP-N-乙酰氨基葡萄糖-1-羧基转移酶-1-基因(*murAA*)、UDP-N-乙酰壁氨酰-L-丙氨酰-D-谷氨酸-L-赖氨酸连接酶基因(*murE*)等转录水平均无明显改变($P > 0.05$)。

讨论

万古霉素耐药相关双组分系统 VraSR 主要通过感应细胞壁的损伤激活下游基因(耐药及毒力相关基因)的转录,从而调控金黄色葡萄球菌的耐药表型、毒力及生物膜的形成等^[7-9]。研究表明,金黄色葡萄球菌 *vraSR* 基因敲除株对甲氧西林、万古霉素和达托霉素这类靶向细胞壁的抗生素耐药性降低,在透射电镜(TEM)下观察发现 *vraSR* 突变株细胞壁明显较薄,且更容易被中性粒细胞吞噬^[10-11]。以 VraSR 为靶点的抑制剂可恢复耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)

表 2 表皮葡萄球菌 SE1457 与 ΔvraSR 转录组测序分析及验证
Table 2 Analysis and validation of *S. epidermidis* 1457 and ΔvraSR transcriptome sequencing

基因和位点 Gene and locus	描述或预测的功能 Description or predicted function	未添加万古霉素 (突变株/野生株) Van- (mutant/WT)		添加万古霉素 (突变株/野生株) Van+ (mutant/WT)	
		RNA seq	qRT-PCR	RNA seq	qRT-PCR
Drug tolerance					
vraR	DNA-binding response regulator VraR	0	ND	0	ND
vraS	sensor histidine kinase VraS	0	ND	0	ND
lrgA	holin-like protein LrgA	-	0.10±0.11	-	0.13±0.08
cidA	LrgA family protein	-	4.60±0.46	-	3.60±1.54
murAA	UDP-N-acetylglucosamine1-carboxyvinyltransferase 1	-	1.08±0.13	-	1.20±0.75
murE	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate-L-lysine ligase	-	0.99±0.20	-	1.57±1.29
stgB	transglycosylase domain protein	-	0.85±0.25	-	0.08±0.30
SERP2380	MFS transporter, DHA2 family, multidrug resistance protein	0.07	0.37±0.12	0.16	0.17±0.03
pbp1	Penicillin-binding protein 1	-	ND	-	ND
pbp2	Penicillin-binding protein 2	-	1.06±0.19	-	ND
Pbp3	Penicillin-binding protein 3	-	ND	-	ND
Glycolysis/gluconeogenesis					
SERP2112	alcohol dehydrogenase	0.17	ND	-	ND
SERP0224	glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase	0.16	ND	-	ND
pgk	phosphoglycerate kinase	0.16	ND	-	ND
SERP2257	meso-butanediol dehydrogenase	0.04	ND	-	ND
SERP2379	oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family	0.15	ND	-	ND
ppdK	pyruvate phosphate dikinase	5.9	ND	-	ND
SERP1250	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	7.94	ND	-	ND
mgo-2	malate:quinone oxidoreductase	3.73	ND	-	ND
geh-1	lipase	4.84	ND	0.81	ND
gntK	gluconokinase	-	0.34±0.19	0.1	0.10±0.08
gntP	gluconate transporter	-	ND	0.14	ND
gntR	gluconate operon transcriptional repressor	-	ND	0.11	ND
gdh	glucose 1-dehydrogenase	-	ND	3.84	ND
fruK	1-phosphofructokinase	-	11.43±2.99	37.53	7.20±2.92
gapR	gap transcriptional regulator	-	ND	6.41	ND
glpD	aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-	0.38±0.11	-	0.50±0.23
Pentose phosphate pathway					
SERP2381	fumarate reductase flavoprotein subunit	0.06	0.17±0.08	0.13	0.23±0.11
sdhA	succinate dehydrogenase	0.28	0.65±0.13	-	2.02±0.49
purN	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	0.08	ND	-	ND
purH	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	0.09	ND	-	ND
nrdG	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein	0.07	ND	-	ND
nrdD	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	0.08	ND	-	ND
Biofilm formation					
pflA	pyruvate formate-lyase-activating enzyme	0.02	ND	-	ND
pflB	formate acetyltransferase	0.04	ND	-	ND
icaA	intercellular adhesion protein A	-	0.17±0.05	-	0.44±0.06
icaR	intercellular adhesion regulator	-	9.27±4.4	-	4.35±0.79
Phosphate transport system					
SERP2114	glucose PTS system EIICBA or EIICB component	0.06	ND	-	2.34±1.38
fruA	PTS fructose transporter subunit IIC	-	ND	24.93	ND
galU	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	-	ND	0.23	ND
Riboflavin metabolism					
ribBA	3,4-dihydroxy 2-butanone 4-phosphate synthase	-	ND	7.46	ND
ribD	riboflavin biosynthesis protein RibD	-	ND	9.13	ND
ribE	riboflavin synthase, alpha subunit	-	ND	9.13	ND
ribH	riboflavin synthase, beta subunit	-	ND	11	ND
DNA replication					
SERP2406	DNA-binding response regulator, AraC famil	15.7	ND	-	ND
SERP1248	replication initiation and membrane attachment protein	2.38	ND	-	ND
uraA	uracil permease	-	ND	43.76	ND
thyA-2	thymidylate synthase	-	ND	6.18	ND
ssb	single-stranded DNA-binding protein	-	ND	10.24	ND
SERP0357	DeoR family transcriptional regulator	-	ND	40.5	ND
pvrR	pyrimidine operon regulatory protein	-	ND	10.23	ND
protein synthesis					
gltD	glutamate synthase (NADPH) small chain	0.12	0.44±0.37	0.19	0.26±0.09
narG	nitrate reductase / nitrite oxidoreductase, alpha subunit	-	ND	0.19	ND
narH	nitrate reductase / nitrite oxidoreductase, beta subunit	-	ND	0.2	ND
rplJ	ribosomal protein L10	-	ND	7.73	ND
rplO	ribosomal protein L15	-	ND	6.36	ND

注:qRT-PCR 数据结果为 3 次独立实验结果,转录水平用平均值±标准差表示。ND,没有检测;- ,无统计学意义。

对抗生素的敏感性。不仅如此, *VraSR* 还调控葡萄球菌毒力因子的表达。Dai 等^[12]报道在万古霉素中介耐药金黄色葡萄球菌(VISA)和异质性万古霉素中介耐药的金黄色葡萄球菌(hVISA)中 *vraSR* 的转录水平上调,毒力相关基因(*hla*、*hly*、*coa*、*RNAlII*、*agrA*、*saeR*)转录水平下调,然而电泳凝胶阻滞试验(EMSA)显示反应调节蛋白 *VraR* 并不能与 VISA 和 hVISA 的上述毒力基因启动子区域结合,表明 *VraSR* 可能间接调控金黄色葡萄球菌毒力基因的转录,其在表皮葡萄球菌中的作用尚不明确。

有研究表明,在 Van 压力下(3×MIC)表皮葡萄球菌(SE1457) *vraS/vraR* 表达水平显著增高(约13倍),敲除 *vraSR* 后细胞壁明显变薄,对环境压力(抗生素、SDS)敏感性增强^[13]。提示作用于细胞壁的抗生素能激活葡萄球菌 TCS-*VraSR* 以应对环境压力。本研究通过转录组测序比较两种条件下(Van-/Van+) *vraSR* 突变株与 SE1457 野生株的差异表达基因,并通过 qRT-PCR 验证,以探索表皮葡萄球菌 *VraSR* 的生物学功能。

Van+/Van-条件下有关糖酵解和糖异生、柠檬酸循环、磷酸戊糖途径基因转录水平整体下调, Van+ 条件下显著下调基因富集在磷酸戊糖途径, Van- 条件下显著上调基因富集在蛋白质合成途径。肽聚糖是革兰阳性球菌细胞壁的重要组成成分。在两种条件下,转录水平下调的差异表达基因都映射到糖代谢和糖异生途径,进而影响肽聚糖的合成。另外,磷壁酸也是革兰阳性菌细胞壁的主要成分,也是磷酸戊糖途径和糖酵解的产物,磷酸戊糖途径相关基因的转录水平下调可能会导致磷壁酸合成水平下降,使 *vraSR* 突变株细胞壁不完整,对靶向细胞壁的抗生素敏感性增加,或抵抗外界环境压力的耐受性下降。

研究发现, *VraSR* 在金黄色葡萄球菌中被认为是一种与耐药性相关的调节系统,可通过调节与肽聚糖合成相关基因的转录来影响金黄色葡萄球菌的药物敏感性^[14-15],在细菌细胞壁受到抗生素作用时, *VraSR* 系统能快速诱导一些耐药相关基因的表达,如 *pbp2* (青霉素结合蛋白)、*stgB* (糖基转移酶)、*murZ* (UDP-N-乙酰氨基葡萄糖烯醇丙酮酸转移酶)等^[16-17],以应对细菌所处环境压力的改变。Levinger 等^[18]的研究表明, *vraSR* 基因控制着金黄色葡萄球菌的耐药性,选取金黄色葡萄球菌 N315 构建 *vraSR* 基因缺失株,其细胞壁合成相关基因(如 *pbp2*、*stgB* 和 *murZ* 等)转录水平下调,并对细胞壁的抗生素敏感性增加。然而,本研究前期发现,敲除 *vraSR* 后表皮葡萄球菌突变株对万古霉素、氨苄西林、头孢呋辛的敏感性增加,而对庆大霉素、四环素、左氧氟沙星的敏感性差异不明

显。qRT-PCR 和 Van+/Van-两种条件下的测序结果均显示, Δ *vraSR* 突变株耐药相关基因 *pbp2*、*serp1412*、*murAA* 等的转录水平与 SE1457 相比无显著差异,表明 *VraSR* 可能间接调控表皮葡萄球菌的药物敏感性,与金黄色葡萄球菌 *VraSR* 的调控机制不同。

此外,表皮葡萄球菌在致病性上亦不同于金黄色葡萄球菌,其主要在生物材料表面形成生物膜而致病,生物膜一旦形成根除的方法只有取出植入物,细菌生物膜是引起耐药性增加和持续感染的主要因素,并能增强细菌抵抗宿主免疫系统的攻击。生物膜是由胞外多聚物质(extracellular polymeric substance, EPS)包裹细菌形成的膜状群体^[19],而 EPS 的主要成分是细胞多糖间黏附素(polysaccharide intercellular adhesion, PIA),PIA 的合成与 *ica* 操纵子编码的蛋白质关系密切。用 qRT-PCR 进一步验证生物膜形成相关基因的转录水平,在 Van+/Van-条件下 Δ *vraSR* 突变株中 *icaA*、*lrgA* 基因下调, *icaR*、*cidA* 基因上调,这可能是 Δ *vraSR* 突变株生物膜形成降低的原因,与 Wu 等^[13]的研究结果一致。另外, *VraSR* 可能还通过 *CidA-LrgA* 调控表皮葡萄球菌的程序性细胞死亡,具体机制还待进一步研究。

在对照筛选中,有部分基因在 Van+/Van-两种条件下的转录水平改变不一致或不符合筛选标准,在排除了这些因素后得到的显著差异表达基因中 *VraSR* 可能直接调控的基因有 *serp2380*、*serp2381* 和 *gltD*,并通过 qRT-PCR 验证与转录组测序结果一致。*serp2380* 基因在金黄色葡萄球菌中编码一种药物转运蛋白^[20],基因的过表达使菌株对亲水性喹诺酮类药物敏感性增加,但是在常规实验室条件下细菌的该基因表达量通常较低。*serp2381* 基因编码延胡索酸还原酶黄素蛋白亚基,参与多种途径,如柠檬酸循环、氧化磷酸化、丙酮酸代谢等。Van Hellemond 等^[21]报道延胡索酸还原酶能够催化延胡索酸还原为琥珀酸,是许多细菌无氧呼吸的关键酶,同时还能作为电子末端受体。*gltD* 基因编码谷氨酸合成酶亚基,谷氨酸合成酶是一种复杂的铁硫黄素蛋白,催化 L-谷氨酰胺和 2-酮戊二酸形成 L-谷氨酸,同时与谷氨酰胺合成酶一起参与了氮同化过程,在氨基酸合成和氮代谢中起到重要作用,这些基因在表皮葡萄球菌中的作用还有待进一步研究。

Illumina 测序技术^[22]因其高通量、高质量和价格低已经成为目前国内外研究的重要选择。本研究采用该技术在转录组测序验证过程(qRT-PCR)中发现了部分有意义的基因,但在转录组测序结果中无统计学意义($P>0.05$),这些基因还有待考证。通过对表

皮葡萄球菌 SE1457 野生株和 *vraSR* 敲除突变株在 Van⁺/Van⁻条件下的转录组测序分析,并筛选出可能受 *VraSR* 调控的靶基因,对探究其生物学功能具有重要意义。

【参考文献】

- [1] Alam MT, Petit RA, Crispell EK, et al. Dissecting vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus* using genome-wide association [J]. *Genome Biol Evol*, 2014, 6(5):1174-1185.
- [2] Dayan GH, Mohamed N, Scully IL, et al. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2016, 15(11):1373-1392.
- [3] Gonzalez T, Biagini Myers JM, Herr AB, et al. Staphylococcal biofilms in atopic dermatitis [J]. *Current Allergy Asthma Reports*, 2017, 17(12):1-11.
- [4] Kawada-Matsuo M, Yoshida Y, Zendo T, et al. Three distinct two-component systems are involved in resistance to the class I bacteriocins, Nukacin ISK-1 and nisin A, in *Staphylococcus aureus* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e69455.
- [5] Gao R, Mack TR, Stock AM. Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains [J]. *Trend Biochem Sci*, 2007, 32(5):225-234.
- [6] Haag AF, Bagnoli F. The role of two-component signal transduction systems in *Staphylococcus aureus* virulence regulation [J]. *Current Topics Microbiol Immunol*, 2015:145-198.
- [7] Sengupta M, Jain V, Wilkinson BJ, et al. Chromatin immunoprecipitation identifies genes under direct *VraSR* regulation in *Staphylococcus aureus* [J]. *Canadian J Microbiol*, 2012, 58(6):703-708.
- [8] Mehta S, Cuirolo AX, Plata KB, et al. *VraSR* two-component regulatory system contributes to *mprF*-mediated decreased susceptibility to daptomycin *in vivo*-selected clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrobial Agents Chemother*, 2012, 56(1):92-102.
- [9] Yin S, Daum RS, Boyle-Vavra S. *VraSR* two-component regulatory system and its role in induction of *pbp2* and *vraSR* expression by cell wall antimicrobials in *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrobial Agents Chemother*, 2006, 50(1):336-343.
- [10] Gao C, Dai Y, Chang W, et al. *VraSR* has an important role in immune evasion of *Staphylococcus aureus* with low level vancomycin resistance [J]. *Microbes Infect*, 2019, 21(8-9):361-367.
- [11] Taglialegna A, Varela MC, Rosato RR, et al. *VraSR* and virulence trait modulation during daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection [J]. *MSphere*, 2019, 4(1):e00557-18.
- [12] Dai Y, Gao C, Chen L, et al. Heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* uses the *VraSR* regulatory system to modulate autophagy for increased intracellular survival in macrophage-like cell line raw264.7 [J]. *Front Microbiol*, 2019:1222.
- [13] Wu Y, Meng Y, Qian L, et al. The Vancomycin resistance-associated regulatory system *vrasr* modulates biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* in an *ica*-dependent manner [J]. *MSphere*, 2021, 6(5):e00641-21.
- [14] Belcheva A, Golemi-Kotra D. A close-up view of the *VraSR* two-component system: a mediator of *Staphylococcus aureus* response to cell wall damage [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(18):12354-12364.
- [15] Gardete S, Wu S, Gill S, et al. Role of *VraSR* in antibiotic resistance and antibiotic-induced stress response in *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrobial Agents Chemother*, 2006, 50(10):3424-3434.
- [16] Boyle-Vavra S, Yin S, Jo DS, et al. *VraT/YvqF* is required for methicillin resistance and activation of the *VraSR* regulon in *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrobial Agents Chemother*, 2013, 57(1):83-95.
- [17] Jo DS, Montgomery CP, Yin S, et al. Improved oxacillin treatment outcomes in experimental skin and lung infection by a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate with a *vraSR* operon deletion [J]. *Antimicrobial Agents Chemother*, 2011, 55(6):2818-2823.
- [18] Levinger O, Bikels-Goshen T, Landau E, et al. *Epigallocatechin gallate* induces upregulation of the two-component *VraSR* system by evoking a cell wall stress response in *Staphylococcus aureus* [J]. *Applied Environmental Microbiol*, 2012, 78(22):7954-7959.
- [19] Sutherland I W. The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment [J]. *Trends Microbiol*, 2001, 9(5):222-227.
- [20] Truong-Bolduc Q, Dunman P, Strahilevitz J, et al. *MgrA* is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus* [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(7):2395-2405.
- [21] Van Hellemond JJ, Tielens A. Expression and functional properties of fumarate reductase [J]. *Biochem J*, 1994, 304(Pt 2):321.
- [22] Du J, Gao S, Tian Z, et al. Transcriptome analysis of responses to bluetongue virus infection in *Aedes albopictus* cells [J]. *BMC Microbiol*, 2019, 19(1):1-11.

【收稿日期】 2022-05-20 【修回日期】 2022-08-12