

本文引用: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.

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

朱娟,陈丽华,余鹏飞,谭芮辰,王妍乐,伍勇*

(中南大学湘雅三医院,湖南长沙 410013)

〔摘要〕 目的 研究表皮葡萄球菌 *icaA* 和 *icaR* 基因与生物被膜形成的相关性。方法 收集湘雅三医院机械通气患者分离表皮葡萄球菌 26 株,按生物被膜成膜能力分成生物被膜阳性菌组和生物被膜阴性菌组各 13 株。采用 RT-PCR 分别对 2 组细菌 *icaA* 和 *icaR* 基因灰度比进行检测;采用 real-time PCR 分别检测 2 组细菌 *icaA* 和 *icaR* 基因的表达,并通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行相对定量。结果 RT-PCR 结果显示 *icaA* 基因在生物被膜阳性组中的灰度比为 0.96~1.38,在生物被膜阴性组中为 0.89~1.56,表达差异无统计学意义($T=10.65$, $P=0.057$);同理,*icaR* 基因在生物被膜阳性组中的灰度比为 0.79~1.24,在生物被膜阴性组中则为 0.80~1.36,表达差异亦无统计学意义($T=14.62$, $P=0.479$)。但 *icaA* 基因在生物被膜阳性组中的平均秩(16.35)明显高于生物被膜阴性菌组(10.65),而 *icaR* 基因生物被膜阳性组的平均秩(12.38)明显小于生物被膜阴性菌组(14.62)。real-time PCR 检测发现表皮葡萄球菌生物被膜阳性组 *icaA* 基因的表达量($\Delta Ct=4.86$)是生物被膜阴性组($\Delta Ct=13.57$)的 418.8 倍($t=61.890$, $P<0.01$),而 *icaR* 基因的表达量($\Delta Ct=19.03$)仅为生物被膜阴性组($\Delta Ct=11.85$)的 1/145($t=21.330$, $P<0.01$)。结论 *icaA* 基因与表皮葡萄球菌生物被膜的形成呈正相关,而 *icaR* 基因与表皮葡萄球菌生物被膜的形成呈负相关。

〔关键词〕 表皮葡萄球菌;*icaA*;*icaR*;生物被膜

〔中图分类号〕 R393;R378.1

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.06.003

Research on the Correlations Between *icaA* and *icaR* Genes with Biofilm Formation of *Staphylococcus epidermidis*

ZHU Juan, CHEN Lihua, SHE Pengfei, TAN Ruichen, WANG Yanle, WU Yong*

(Department of Laboratory Medicine, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha,

Hunan 410013, Hunan, China)

〔Abstract〕 **Objective** To study the correlations between *icaA* and *icaR* genes with biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). **Methods** 26 strains of *S. epidermidis* isolated from tracheal catheter of patients with mechanical ventilation in ICU of the Third Xiangya Hospital were collected and divided into biofilm positive group (13 strains) and biofilm negative group (13 strains) according to biofilm formation ability. The gray scale ratios of *icaA* and *icaR* genes in two groups were determined by reverse transcription PCR. The expressions of *icaA* and *icaR* genes in two groups were detected by real time PCR, the relative quantification was measured by using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Results** The RT-PCR showed that the gray scale ratios of *icaA* in positive group and negative group of biofilm-forming were 0.96~1.38 and 0.89~1.56, respectively, the difference

〔收稿日期〕 2017-12-20

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金(2015JJ2188, 2015JJ3165)。

〔作者简介〕 朱娟,女,硕士,主要从事微生物学研究。

〔通讯作者〕 *伍勇,男,教授, E-mail: wuyong_xy@126.com。

was not statistically significant ($T=10.65$, $P=0.057$). The gray scale ratios of *icaR* genes in positive group and negative group of biofilm-forming were 0.79~1.24 and 0.80~1.36, respectively, the expression between the two groups were not statistically significant ($T=14.62$, $P=0.479$). The mean rank and sum of ranks of *icaA* gene in biofilm positive bacteria group (16.35) were significantly higher than those in biofilm negative group (10.65), but the mean rank and sum of ranks of *icaR* gene in biofilm positive bacteria group (12.38) were significantly lower than those in biofilm negative bacteria group (14.62). Real-time PCR showed that the expression of *icaA* gene in *S. epidermidis* in biofilm positive group ($\Delta CT=4.86$) was 418.8 times of that in biofilm negative bacteria group ($\Delta CT=13.57$) ($t=61.890$, $P<0.01$), while the expression of *icaR* gene in biofilm positive group ($\Delta CT=19.03$) was only 1/145 of that in negative group ($\Delta CT=11.85$) ($t=21.330$, $P<0.01$). **Conclusion** *icaA* gene is positively related to the formation of biofilm in *S. epidermidis*, while *icaR* gene is negatively related to the formation of biofilm in *S. epidermidis*.

[**Keywords**] *Staphylococcus epidermidis*; *icaA*; *icaR*; biofilm

表皮葡萄球菌(*staphylococcus epidermidis*)是人体皮肤和黏膜正常菌群之一。近年来,随着各种体内置入设施,如气管插管、中心静脉置管和人工心脏瓣膜等的广泛使用,表皮葡萄球菌已成为医院内感染重要病原菌^[1]。且随着抗生素的不合理使用,表皮葡萄球菌的耐药率有所增加^[2]。此外,表皮葡萄球菌容易形成生物被膜,进而增强菌株耐药性并能使其逃避宿主免疫系统的监控,造成慢性、持续性和反复性感染特点^[3]。研究发现表皮葡萄球菌生物被膜胞外基质的主要成分是胞间多糖粘附素(polysaccharide intercellular adhesion, PIA)^[4]。PIA是*ica*操纵子编码产物,*ica*操纵子全长3.4 kb,包括*icaR*(调节基因)及串联存在的*icaA*、*icaD*、*icaB*和*icaC*基因^[5]。*icaR*基因位于*ica*操纵子的上游,编码合成的*icaR*可与*icaA*基因的起始密码子相结合调控*ica*操纵子的表达^[6]。本文通过分析表皮葡萄球菌临床菌株*icaA*、*icaR*基因与生物被膜形成的关系,进一步了解表皮葡萄菌生物被膜形成的遗传学基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

收集湘雅三医院ICU病房机械通气患者气管内导管和痰液标本中分离出的表皮葡萄球菌单个菌落,于血琼脂平板上纯培养后筛选出的生物被膜阳性和生物被膜阴性表皮葡萄球菌各13株。菌株经Vitek 2 Compact全自动微生物鉴定仪鉴定。生物被膜鉴定参照Freeman等的方法[7]进行,将收集的吸痰标本和装有气管导管的生理盐水漩涡振荡后,分别接种于刚果红平板(LB琼脂培养基中加入刚果红,浓度为0.8 g/L),37℃培养48 h后观察结

果,菌落变为黑色为生物被膜阳性菌株,菌落红色为生物被膜阴性菌株,表皮葡萄球菌标准菌株ATCC RP62A和ATCC12228分别为成膜能力阳性和阴性质控菌株。

1.2 主要试剂及仪器

UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒(上海生工公司);cDNA逆转录试剂盒(Fermentas公司);2×Tap PCR Master Mix、Marker I DNA Ladder、Trans Start Green qPCR SuperMix UDG和Passive Reference Dye/PCR Enhancer(北京全式金生物公司);9700 GeneAmp PCR System(美国PE公司);Gene Genius全自动凝胶成像系统(美国Syngene公司);引物由上海生工公司合成。

1.3 细菌总RNA的提取

取0.5麦氏单位新鲜菌悬液2 μL至3 mL LB液体培养基中,37℃振荡培养16 h。总RNA的提取参照UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒的说明书进行。即在上述菌液中加入1 μL 70%乙醇和100 μL溶菌酶,37℃45 min,再加入1 mL Trizol充分吹打混匀,置冰上15 min。加入氯仿萃取,收集上层水相至干净的EP管中,加入1/2倍体积无水乙醇沉淀,再经RPE溶液离心洗涤后,在吸附柱中央加入30 μL DEPC水收集RNA,并置-70℃保存^[8]。

1.4 cDNA的合成及RT-PCR

根据Fermentas公司试剂盒说明书进行cDNA合成。cDNA合成反应体系为20 μL: Anchored Oligo (dT)18(0.5 μg/μL) 1 μL, 2×ES Reaction Mix 10 μL, Easy Script RT/RI Enzyme Mix 1 μL, RNase-free Water 7 μL, RNA模板1 μL。反应条件为:42℃30 min,

85 °C 5 min, 4 °C 30 min。RT-PCR 反应体系为 (共 20 μL): 16S rRNA 上、下游引物(20 μmol/L)各 0.4 μL, 模版 1.6 μL, Taq Mixture 8 μL, ddH₂O 9.6 μL。反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 40 s, 30 个循环; 72 °C 10 min^[9]。逆转录 *icaA*、*icaR* 和 16S rDNA 的特异性引物序列通过软件 Primer Premier 6.0 设计, 如表 1。

其中, 16S-rRNA 为内参基因。扩增产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳并成像, 并用灰度比来进行对比分析, 即: 各目的基因灰度与 16S-rRNA 灰度的比值, 由 image J 软件进行计算, 实验重复 3 次。

表 1 RT-PCR 扩增基因所用引物

基因名	引物	序列(5'→3')	产物大小(bp)
icaA	正向	TCAATGAGGGAATCAAACAAG	149
	反向	ACGAATACGTGATTACCTGT	
icaR	正向	CTCTTTATCCAAAGCGATGT	119
	反向	CTAGTGCTCCAGAAGCACTG	
16S rRNA	正向	GGAGGAAGCTGGGATGACG	241
	反向	ATGGTGTGACGGCGGTGTC	

1.5 *icaA* 和 *icaR* 基因表达量检测

real-time PCR 反应体系为 25 μL: 2×Trans Start Green qPCR SuperMix UDG 12.5 μL, Passive Reference Dye/PCR Enhancer 0.5 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, cDNA 模板 2.0 μL, MgCl₂ 0.5 μL, ddH₂O 8.5 μL。反应条件为: 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 5 s, 55 °C 15 s, 72 °C 10 s, 45 个循环。最后, 设置溶解曲线程序: 95 °C 1 min, 55 °C 30 s, 95 °C 30 s, 实验重复 3 次^[10]。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行 *icaA* 和 *icaR* 基因相对表达量的计算。其中, $\Delta\Delta Ct = \text{实验组(目的基因 } Ct - \text{内参基因 } Ct) - \text{对照组(目的基因 } Ct - \text{内参基因 } Ct)$ ^[11]。

1.6 统计学分析

偏态分布资料采用秩和检验, 统计量为平均秩 T 。正态分布资料组间采用 SPSS 19.0 软件进行独立样本的 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 *icaA* 和 *icaR* 基因的表达差异

icaA 基因在生物被膜阳性组中的灰度比为 1.17 ± 0.28 , 在生物被膜阴性组中则为 1.23 ± 0.19 , 表

达差异无统计学意义 ($T = 10.65, P = 0.057$); 同理, *icaR* 基因在生物被膜阳性组中的灰度比为 (1.02 ± 0.16) , 在生物被膜阴性组中则为 (1.08 ± 0.20) , 表达差异亦无统计学意义 ($T = 14.62, P = 0.479$)。但 *icaA* 基因生物被膜阳性菌组平均秩 (16.35) 及秩和 (212.5) 明显高于阴性菌组平均秩 (10.65) 及秩和 (138.5); 而 *icaR* 基因生物被膜阳性菌组平均秩 (12.38) 及秩和 (161.0) 明显低于阴性菌组平均秩 (14.62) 及秩和 (190.0), 见图 1。

2.2 real-time PCR 结果

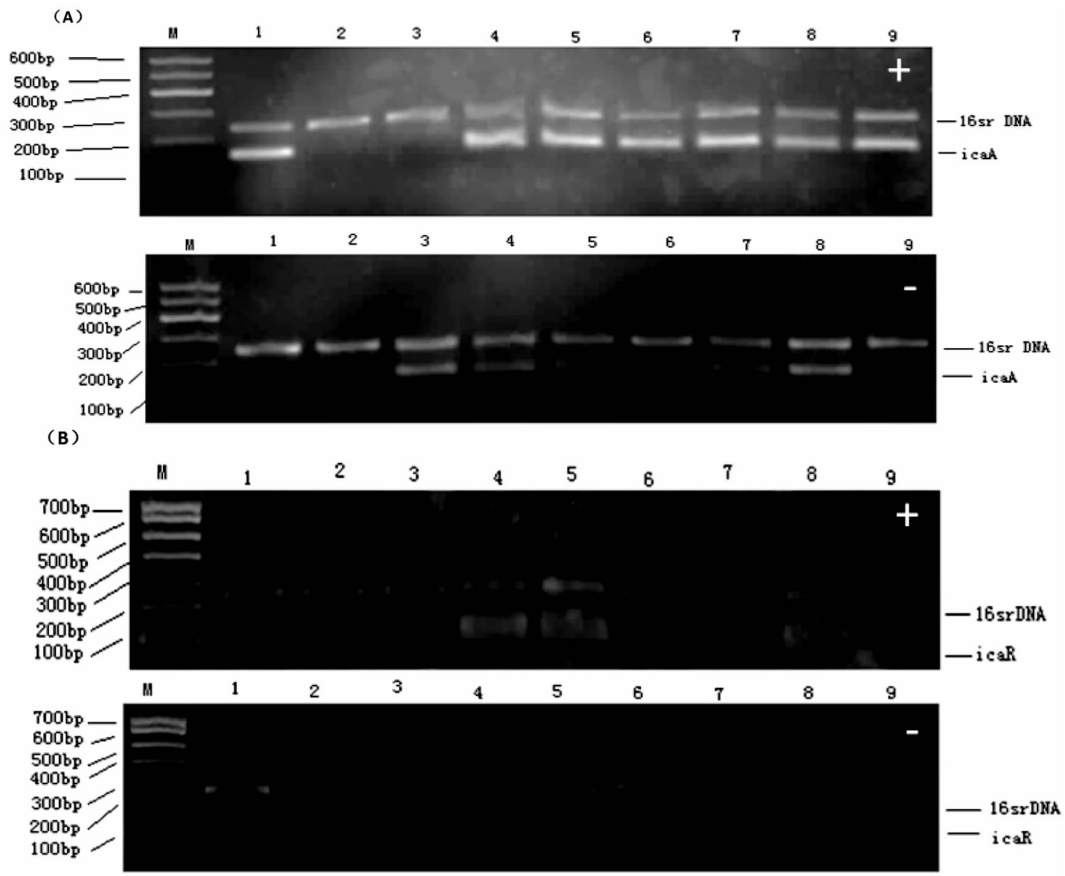
icaA 和 *icaR* 与 16S rDNA 基因的溶解曲线的熔点峰窄且尖, 表明 PCR 产物较纯, 没有非特异性产物和引物二聚体, 各目的基因引物特异性好, 见图 2。生物被膜阳性表皮葡萄球菌 *icaA* 基因转录水平 ($\Delta Ct = 4.86$) 显著超过了生物被膜阴性组 ($\Delta Ct = 13.57$), 是阴性菌组的 (418.8 ± 21.34) 倍 ($t = 61.890, P < 0.01$), 而 *icaR* 基因在表皮葡萄球菌生物被膜阴性菌组 ($\Delta Ct = 11.85$) 中的转录水平是阳性菌组 ($\Delta Ct = 19.03$) 的 (145.0 ± 10.21) 倍 ($t = 21.330, P < 0.01$)。

3 讨论

结果显示, *icaA* 基因在生物被膜阳性菌组中转录水平显著高于阴性菌组, 是阴性菌组的 418.8 倍; 而 *icaR* 在生物被膜阳性菌组中表达量却远远低于阴性菌组, 仅为阴性菌组的 1/145。表明表皮葡萄球菌 *icaA* 基因与其生物被膜的形成呈正相关, 而 *icaR* 基因与表皮葡萄球菌生物被膜的形成呈负相关。

于树云等^[12]发现, 某些表皮葡萄球菌临床株具有形成生物被膜的能力, 而且与 *icaA* 基因的存在及正常表达有关。而王勇翔等^[13]对 19 例表皮葡萄球菌临床分离株通过半定量粘附实验、扫描电子显微镜法和光学显微镜等方法检测发现, 表皮葡萄球菌 *ica* 操纵子的转录水平与生物被膜形成密切相关。与本文研究结论一致。

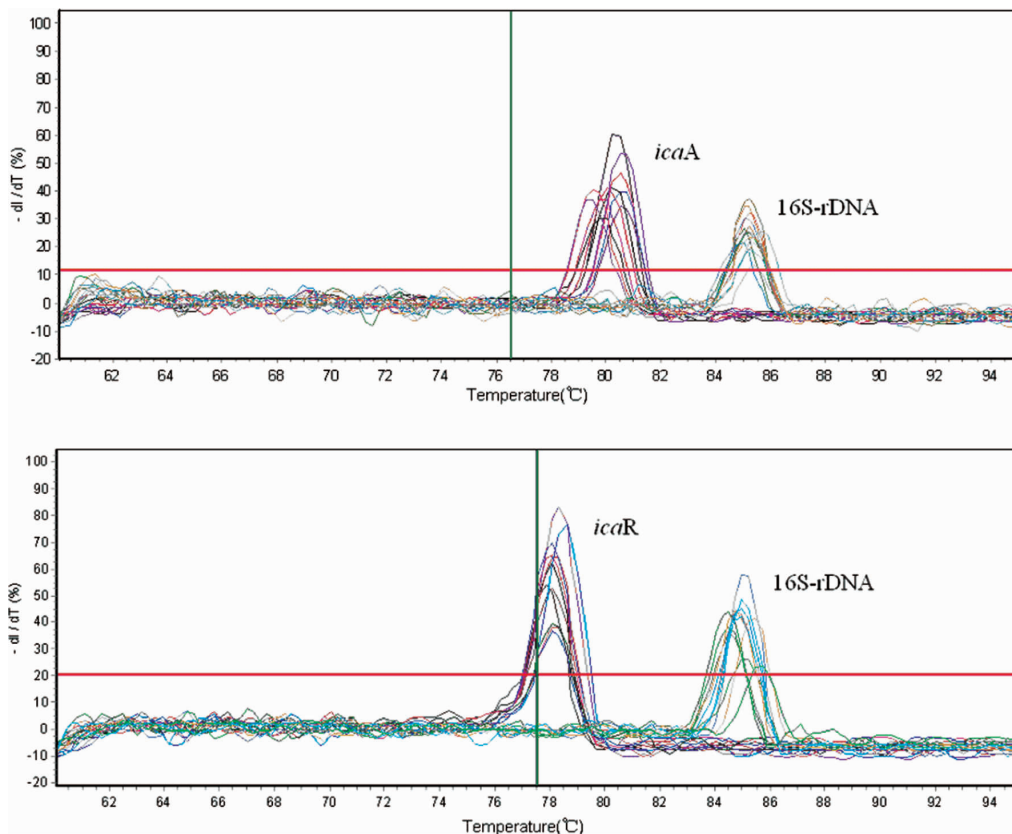
RT-PCR 受干扰的因素颇多, 对于相对定量还存在一定的不足, RNA 的降解等原因对结果的影响较大^[14], 但 real-time PCR 可以为测定基因转录水平研究提供准确可靠的信息^[15]。本研究通过 RT-PCR 检测结果显示 *icaA* 和 *icaR* 两种基因的灰度比值差异不显著, 但随后本研究采用了 real-time PCR 进



注: M.Marker I DNA Ladder; +.生物膜成膜能力阳性菌株; -.生物膜成膜能力阴性菌株。

A: 为生物被膜阳性组(上)和阴性组(下)icaA 基因电泳图; B: 为生物被膜阳性组(上)和阴性组(下)icaR 基因电泳图

图 1 RT-PCR 方法检测 icaA、icaR 基因电泳图



注: 横坐标为温度, 纵坐标为荧光强度随温度的改变量, 一种颜色的曲线代表一株临床菌株。

上图为 icaA 基因与 16S-rDNA 的溶解曲线; 下图为 icaR 基因与 16S-rDNA 的溶解曲线

图 2 icaA、icaR 与 16S-rDNA 的溶解曲线

一步核实,real-time PCR 结果表明,生物被膜阳性表皮葡萄球菌的 icaR 表达水平低,而 icaA 表达水平高;生物被膜阴性表皮葡萄球菌的 icaR 表达水平相对较高,而 icaA 表达水平低。本文菌株数量偏少,需增大菌株量对 icaA 和 icaR 基因调节表皮葡萄球菌生物被膜的形成进一步研究,以便为治疗表皮葡萄球菌生物膜药物的研究提供有力的理论基础。

参考文献:

- [1] 汪复,朱德妹,胡付品,等.2007年中国 CHINET 细菌耐药性检测[J].中国感染与化疗杂志,2008,8(5):325-333.
- [2] 吴红艳,秦春华,余志清.医院抗菌药物临床应用分析[J].湖南中医药大学学报,2013,33(10):84-85.
- [3] ROHDE H, FRANKENBERGER S, ZÄHRINGER U, et al. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections[J]. Eur J Cell Biol, 2010,89(1):103-111.
- [4] BÜTTNER H, MACK D, ROHDE H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 17(1):5-14.
- [5] FIGUEIREDO A M S, FERREIRA F A, BELTRAME C O, et al. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*[J]. 2017, 43(5):602-620.
- [6] O'GARA J P. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2007,270(2):179-188.
- [7] FREEMAN K, WOODS E, WELSBY S, et al. Biofilm evidence and the microbial diversity of horse wounds[J]. Can J Microbiol, 2009, 55(2):197-202.
- [8] FRANCA A, MELO L D, CERCA N. Comparison of RNA extraction methods from biofilm samples of *Staphylococcus epidermidis*[J]. BMC Res Notes, 2011,4:572.
- [9] CHOE H, INABA Y, KOBAYASHI N, et al. Evaluation of the time period for which real-time polymerase chain reaction detects dead bacteria[J]. Pol J Microbiol, 2014, 63(4):393-398.
- [10] CASTELANI L, PILON LE, MARTINS T, et al. Investigation of biofilm production and icaA and icaD genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis[J]. 2015, 86(3):340-344.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [12] 于树云,宋诗铎.表皮葡萄球菌临床株生物被膜形成及其 icaA 基因的分析[J].中华微生物学和免疫学杂志,2009,29(4):302-306.
- [13] 王勇翔,李华林,李平洋,等.表皮葡萄球菌生物膜形成与 ica 操纵子的相关性研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2003,23(6):428-431.
- [14] XU M Y, LIU S Q, DENG C L, et al. Detection of Zika virus by SYBR green one-step real-time RT-PCR[J]. J Virol Methods, 2016, 236:93-97.
- [15] CHOE H, INABA Y, KOBAYASHI N, et al. Evaluation of the time period for which real-time polymerase chain reaction detects dead bacteria[J]. Pol J Microbiol, 2014,63(4):393-398.

(本文编辑 杨 瑛)