

摘要

金黄色葡萄球菌，革兰氏阳性，通常与人类或动物共生，是一种条件致病菌。其广泛地分布在自然界中，是一种常见的食品污染菌，在许多国家的食物中毒事件报道中列居第 2 位，仅次于沙门氏菌。在乳制品行业中，*S. aureus* 会引起奶牛罹患乳腺炎，患病奶牛所产牛奶也会受到 *S. aureus* 的污染。而在乳制品加工过程中，存在许多不良环境，包括高温、高压和干燥等，因此 *S. aureus* 抗逆性分子机制研究对于防治污染具有重要研究价值。实验室前期通过高温、渗透压、干燥等一系列逆境实验筛选出了 Mfd 蛋白，它通常被描述为一种 DNA 修复蛋白，是一种转录修复偶联因子。Mfd 在 *S. aureus* 中的研究甚少，目前已知的仅有 Mfd 参与预防氧化应激、免疫反应和药物引起的 DNA 损伤，以及 *S. aureus* 中 Mfd 表达的减少会导致生物被膜形成减少，而具体机制还待进一步分析。本研究将以此为切入点进行相关实验和研究，探究 Mfd 调控 *S. aureus* 抗逆性的分子机制。

在本课题中，我们对 *S. aureus* RMSA 24 的抗逆性相关调控机制展开研究，通过基因回补、生长曲线实验、抗逆性实验（高温实验、酸碱实验）、生物被膜相关实验（生物被膜成分分析实验、胞外多糖实验、蛋白含量测定实验、Triton X-100 自溶实验、溶血实验）、转录组测序以及实时荧光定量 PCR 实验，探究转录修复偶联因子 Mfd 对 *S. aureus* 抗逆性分子机制调控的研究。本研究的目的在于为乳源性 *S. aureus* 的抗逆机制提供依据，有助于预防该菌引起的乳制品污染，为治疗 *S. aureus* 感染提供一种新思路。相关研究结果如下。

1. 通过 PCR 验证 C-*mfd* 回补株构建成功。对野生株、突变株和回补株进行抗逆性相关实验，实验表明，*mfd* 基因突变后，菌株对热应激抵抗力和 pH 耐受力均有所减弱。

2. 对野生株、突变株、回补株进行生物被膜相关实验。结果显示，野生株 RMSA 24 生物被膜主要成分为蛋白质，*mfd* 基因突变后，促进了 PIA 的合成，加快了自溶速率，促进了 eDNA 的合成，抑制了蛋白质的合成，总体生物被膜含量减少。同时，*mfd* 突变降低了 *S. aureus* 的溶血能力。

3. 对野生型菌株 RMSA 24 和 M-*mfd* 进行转录组测序，测序结果总共定量了 2649 个基因的转录水平，其中有 173 个基因转录本被定义为 DEGs，从中选取与生物被膜和溶血相关的 12 个基因，进行实时荧光定量 PCR 实验。结果显示，与野生型菌株相比，M-*mfd* 的 PIA 相关基因 *sarX* 的转录水平被上调了 4 倍；自溶相关基因 *yycI*、*walkK* 和 *cidA* 的转录水平分别被上调了 1.3 倍、1.2 倍和 2.6 倍，*lrgA* 的转录水

平被下调了 2 倍；蛋白质相关基因 *clfA* 的转录水平被下调了 2 倍；溶血相关基因 *hld*、*hlgB* 和 *hlgC* 的转录水平也均被下调了 1.7 倍，5 倍和 2.5 倍，上述结果与表型结果一致。

关键词：金黄色葡萄球菌；抗逆性；Mfd 转录修复偶联因子；生物被膜；溶血

ABSTRACT

Staphylococcus aureus, Gram-positive, is usually symbiotic with humans or animals and is an opportunistic pathogen. It is widely distributed in nature, is a common food contamination bacteria, in many countries in the food poisoning incident reports ranked second, only after Salmonella. In the dairy industry, *S. aureus* can cause mastitis in cows, and milk produced by infected cows can also be contaminated with *S. aureus*. However, there are many adverse environments in the processing of dairy products, including high temperature, high pressure and dryness. Therefore, the study on the molecular mechanism of *S. aureus* stress resistance has important research value for pollution prevention and control. The Mfd protein was screened by a series of stress experiments, such as high temperature, osmotic pressure and drying. It is usually described as a DNA repair protein and a transcription repair coupling factor. There are few studies on Mfd in *S. aureus*. Currently, only Mfd is known to be involved in the prevention of oxidative stress, immune response and drug-induced DNA damage, as well as the reduction of Mfd expression in *S. aureus* can lead to reduced biofilm formation, and the specific mechanism remains to be further analyzed. This study will take this as the breakthrough point to conduct relevant experiments and studies to explore the molecular mechanism of Mfd regulating *S. aureus* stress resistance.

In this study, we study the stress-related regulatory mechanism of *S. aureus* RMSA 24. Through gene backup, growth curve experiment, stress resistance experiment (high temperature experiment, acid base experiment), biofilm-related experiment (biofilm composition analysis experiment, extracellular polysaccharide experiment, protein content determination experiment, Triton X-100 autolysis experiment, hemolysis experiment), transcriptome sequencing and real-time fluorescence quantitative PCR experiment, To explore the regulation of transcription repair coupling factor Mfd on the molecular mechanism of *S. aureus* stress resistance. The purpose of this study is to provide a basis for the anti-stress mechanism of lactogenic *S. aureus*, to help prevent the contamination of dairy products caused by the bacteria, and to provide a new idea for the treatment of *S. aureus* infection.

1. The successful construction of C-*mfd* complement strain was verified by PCR. Stress resistance of wild, mutant and back-up strains were tested. The results showed that the strain's resistance to heat stress and pH tolerance were weakened after the mutation of *mfd*

gene.

2. Biofilm-related experiments were performed on the wild strains, mutant strains and complement strains. The results showed that the biofilm of RMSA 24 was mainly composed of protein. The mutation of *mfd* gene promoted the synthesis of PIA and eDNA, inhibited the synthesis of protein, and reduced the biofilm content. At the same time, the *mfd* mutation decreased the hemolytic ability of *S. aureus*.

3. The wild type strain RMSA 24 and M-*mfd* mutant were sequenced by transcriptome. A total of 2649 genes were quantified by sequencing results, among which 173 gene transcripts were defined as DEGs. 12 genes related to biofilm and hemolysis were selected for real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that the transcription level of the Ia-related gene *sarX* in M-*mfd* mutant was up-regulated by a factor of 4 compared with the wild type strain. The transcription levels of autolysis-related genes *yycI*, *walkK* and *cidA* were up-regulated by 1.3 times, 1.2 times and 2.6 times, respectively, while the transcription levels of *lrgA* were down-regulated by 2 times. Transcription levels of the protein-related gene *clfA* were down-regulated by a factor of two; The transcription levels of hemolysis-related genes *hld*, *hlgB* and *hlgC* were also down-regulated by 1.7 times, 5 times and 2.5 times, which were consistent with the phenotypic results.

KEYWORDS: *Staphylococcus aureus*; Stress resistance; Mfd transcription repair coupling factor; Molecular mechanism; Biofilm; Hemolysis

目录

致谢.....	I
摘要.....	II
ABSTRACT.....	IV
目录.....	VI
插图清单.....	VIII
表格清单.....	X
英文缩写词表.....	XI
第一章 绪论.....	1
1.1 金黄色葡萄球菌概述.....	1
1.1.1 金黄色葡萄球菌生物学特性.....	1
1.1.2 金黄色葡萄球菌引起食物中毒.....	2
1.1.3 金黄色葡萄球菌的抗逆性研究.....	3
1.2 金黄色葡萄球菌毒力因子.....	3
1.2.1 肠毒素.....	4
1.2.2 溶血素.....	5
1.2.3 其他毒力因子.....	6
1.3 生物被膜.....	7
1.3.1 生物被膜的简介.....	7
1.3.2 生物被膜胞外基质的成分.....	8
1.3.3 生物被膜的发育过程.....	9
1.3.4 生物被膜形成的调控.....	9
1.4 转录修复偶联因子 Mfd.....	10
1.5 研究目的与意义.....	11
1.6 研究内容.....	11
第二章 材料与方法.....	13
2.1 实验材料.....	13
2.1.1 实验菌株.....	13
2.1.2 实验试剂.....	13
2.1.3 实验仪器.....	13
2.1.4 引物序列.....	14
2.1.5 培养基和主要试剂配制.....	15

2.2 实验方法.....	16
2.2.1 分子生物学相关实验.....	16
2.2.2 表型实验方法.....	20
2.2.3 转录组测序和文库构建.....	23
2.2.4 RNA 分子生物学实验.....	24
第三章 结果与分析.....	29
3.1 金黄色葡萄球菌 <i>mfd</i> 基因回补株的鉴定.....	29
3.1.1 互补菌株构建的电转化.....	29
3.1.2 质粒 pLI50- <i>mfd</i> 电转化成功菌株的酶切验证.....	31
3.1.3 互补菌株构建的进一步 PCR 测序验证.....	32
3.2 <i>mfd</i> 基因对金葡菌表型的影响.....	33
3.2.1 生长曲线.....	33
3.2.2 热应激抵抗力.....	33
3.2.3 pH 耐受力.....	34
3.2.4 生物被膜形成能力.....	35
3.2.5 PIA 形成能力.....	35
3.2.6 胞外多糖含量.....	37
3.2.7 生物被膜中蛋白质含量.....	38
3.2.8 Triton X-100 诱导自溶能力.....	39
3.2.9 溶血能力.....	40
3.3 转录组测序结果分析.....	41
3.4 RT-qPCR 检测 <i>mfd</i> 突变对金葡菌表型相关基因转录水平的影响.....	47
3.4.1 总 RNA 的提取.....	47
3.4.2 PIA 相关基因转录水平的检测.....	48
3.4.3 蛋白质相关基因转录水平的检测.....	49
3.4.4 自溶相关基因转录水平的检测.....	49
3.4.5 溶血相关基因转录水平的检测.....	50
第四章 讨论与结论.....	52
4.1 讨论.....	52
4.2 结论.....	54
参考文献.....	56
作者简介.....	67

插图清单

图 1-1 金黄色葡萄球菌在显微镜下的形态.....	1
图 1-2 金黄色葡萄球菌菌落在普通培养基中的形态.....	2
图 1-3 金黄色葡萄球菌菌落在血平板上的形态.....	2
图 1-4 金黄色葡萄球菌毒力因子.....	4
图 1-5 Hla 的作用机制.....	5
图 1-6 生物被膜生长周期模型 ^[116]	9
图 1-7 技术路线.....	12
图 3-1 <i>mfd</i> 基因完整序列.....	30
图 3-2 目的基因片段.....	31
图 3-3 回补株构建流程图.....	31
图 3-4 <i>C-mfd</i> 质粒酶切验证电泳图.....	32
图 3-5 <i>C-mfd</i> PCR 电泳图.....	32
图 3-6 测序结果.....	32
图 3-7 RMSA24、 <i>M-mfd</i> 、 <i>C-mfd</i> 生长曲线.....	33
图 3-8 RMSA24、 <i>M-mfd</i> 、 <i>C-mfd</i> 对热应激的抵抗力；*代表 $P < 0.1$	34
图 3-9 RMSA24、 <i>M-mfd</i> 、 <i>C-mfd</i> 对 pH 耐受力的比较；**代表 $P < 0.01$	34
图 3-10 96 孔板法检测 RMSA24、 <i>M-mfd</i> 、 <i>C-mfd</i> 生物被膜形成的差异；**代表 $P < 0.01$	35
图 3-11 刚果红法鉴定金葡菌 PIA 的形成.....	36
图 3-12 RMSA24 生物被膜成分分析.....	37
图 3-13 野生株、突变株和回补株胞外多糖含量的区别.....	38
图 3-14 野生株、突变株和回补株蛋白质含量的区别.....	39
图 3-15 Triton X-100 诱导的自溶检测；**** 代表 $P < 0.0001$ ，*** 代表 $P < 0.001$ ，**代表 $P < 0.01$ ，* 代表 $P < 0.1$	40
图 3-16 野生株、突变株和回补株溶血能力的比较.....	41
图 3-17 <i>mfd</i> 突变株基因转录本的鉴定与分析.....	42
图 3-18 <i>mfd</i> 基因突变株及其野生型菌株的 DEGs 的 GO 分析.....	44
图 3-19 突变株及野生株的 DEGs 的 KEGG 途径分析.....	46
图 3-20 总 RNA 电泳图.....	48
图 3-21 野生株 RMSA24 与突变株 <i>M-mfd</i> 中 PIA 相关基因表达水平的检测；**代表 $P < 0.01$	49

图 3-22 野生株 RMSA24 与突变株 <i>M-mfd</i> 中蛋白质相关基因表达水平的检测；**代表 $P < 0.01$	49
图 3-23 野生株 RMSA24 与突变株 <i>M-mfd</i> 中自溶相关基因表达水平的检测；****代表 $P < 0.0001$ ；**代表 $P < 0.01$	50
图 3-24 野生株 RMSA24 与突变株 <i>M-mfd</i> 中溶血相关基因表达水平的检测；****代表 $P < 0.0001$	51

表格清单

表 1-1 一些常见 SEs 的独特功能.....	5
表 1-2 本综述中讨论的毒力因子.....	7
表 2-1 本实验所用的菌株.....	13
表 2-2 本实验主要试剂.....	13
表 2-3 主要仪器与设备.....	14
表 2-4 本研究所使用的引物序列.....	14
表 2-5 酶切体系.....	20
表 2-6 逆转录引物序列.....	26
表 2-7 gDNA 的去除.....	27
表 2-8 cDNA 的合成.....	27
表 2-9 反转录条件.....	27
表 2-10 RT-qPCR 反应体系.....	28
表 2-11 RT-qPCR 反应程序.....	28
表 3-1 部分差异基因.....	47
表 3-2 RNA 提取得率检测.....	48

英文缩写词表

英文缩写	英文全称	中文全称
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	金黄色葡萄球菌
DNA	Deoxyribonucleotide acid	脱氧核糖核酸
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
eDNA	environmental Deoxyribonucleotide acid	胞外脱氧核糖核酸
TSB	Trypticase Soy Broth Medium	胰酪胨大豆肉汤培养基
OD	Optical density	光密度
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
cDNA	complementary Deoxyribonucleotide acid	互补脱氧核糖核酸
RT-qPCR	Real-time quantitative reverse transcription PCR	反转录实时荧光定量 PCR
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin	细胞间多糖粘附素
PNAG	Polymeric N-acetyl-glucosamine	乙酰葡萄糖胺聚合物
SEs	<i>Staphylococcal</i> enterotoxins	葡萄球菌肠毒素
SFP	<i>Staphylococcus</i> food poisoning	葡萄球菌性食物中毒
ADAM10	A Disintegrin And Metalloproteinase 10	解整合素金属蛋白酶 10
AI-2	Autoinducer-2	自诱导物 2
SPA	<i>Staphylococcal</i> protein A	葡萄球菌蛋白质 A
PSM	Phenol soluble regulator	苯酚可溶性调节素

Eps	Extracellular polymer	胞外聚合物
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules	识别粘附基质分子的微生物表面成分
RNAP	RNA polymerase	RNA 聚合酶
TCR	Transcription-coupled DNA repair	转录偶联 DNA 修复
NER	Nucleotide excision repair	核苷酸切除修复

第一章 绪论

1.1 金黄色葡萄球菌概述

1.1.1 金黄色葡萄球菌生物学特性

金黄色葡萄球菌，无芽孢、鞭毛，大多数无荚膜，是常见的引起食物中毒的致病菌，常见于皮肤表面及上呼吸道黏膜^[1]。典型的 *S. aureus* 形状在显微镜下为圆形，成串排列成葡萄状（见图 1-1），但在液体培养基中则排列成双球状，可在高盐培养基上生长，并形成金黄色、光滑、湿润、微微隆起的菌落，直径大小为 0.5-1.5 μm （见图 1-2）^[2]，无扩展生长特点。将 *S. aureus* 培养在血平板上，菌落形态偏大、偏圆、凸起、湿润，单菌落周围有肉眼可见的完全透明的溶血圈（见图 1-3）^[3]。

S. aureus 对高温有一定的耐受能力，在 80°C 以上的高温环境下持续 30 min 才可以将其彻底杀死，另外 *S. aureus* 可以存活于高盐环境，最高可以耐受浓度为 15% 的 NaCl 溶液。由于细菌本身结构特点，利用 70% 的乙醇可以在几分钟之内将其快速杀死^[4]。*S. aureus* 代谢类型为需氧或兼性厌氧，对环境要求不高，37°C 为最适生长温度，能在各种恶劣环境中存活下来，因此，用一般的营养基质即可正常培养该细菌。



图 1-1 金黄色葡萄球菌在显微镜下的形态^[5]

Fig. 1-1 Morphology of *Staphylococcus aureus* under power microscope

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/766215241002010143>