

表皮葡萄球菌 $\Delta vraSR-lrgAB$ 突变株的构建和生物学特性

尚爽婕¹, 陈卫国¹, 张晓奎¹, 朱健鹏¹, 白松¹, 陈晓婷¹, 武有聪^{1,2*}

1 大理大学 基础医学院, 病原生物学综合实验室, 云南 大理

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

尚爽婕, 陈卫国, 张晓奎, 朱健鹏, 白松, 陈晓婷, 武有聪. 表皮葡萄球菌 $\Delta vraSR-lrgAB$ 突变株的构建和生物学特性[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 629-643.

SHANG Shuangjie, CHEN Weiguo, ZHANG Xiaokui, ZHU Jianpeng, BAI Song, CHEN Xiaoting, WU Youcong. Construction and characterization of $\Delta vraSR-lrgAB$ of *Staphylococcus epidermidis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 629-643.

摘要: 【目的】探究 *VraSR* 通过 *CidA-LrgAB* 系统调控表皮葡萄球菌的生物学功能。【方法】构建重组质粒 $pKOR1-\Delta lrgAB$, 并将其转化至表皮葡萄球菌 SE1457 $\Delta vraSR$ 突变株中。通过同源重组技术, 在 $\Delta vraSR$ 突变株上进一步敲除 *lrgAB* 基因。利用 PCR、RT-PCR 和测序技术鉴定表皮葡萄球菌 $\Delta vraSR-lrgAB$ 疑似突变株, 并检测其生长特性、药物敏感性、自溶能力以及生物被膜形成能力。【结果】成功构建了表皮葡萄球菌 $\Delta vraSR-lrgAB$ 突变株。与表皮葡萄球菌 SE1457、 $\Delta vraSR$ 和 $\Delta lrgAB$ 菌株相比, $\Delta vraSR-lrgAB$ 突变株生长迟缓, 特别是在 25 °C 和 40 °C 下尤为明显 ($P < 0.001$)。该突变株的药物敏感性增强 ($P < 0.01$), 自溶能力显著增强 ($P < 0.001$), 生物被膜形成能力降低 ($P < 0.01$)。【结论】*VraSR* 可能部分通过 *LrgAB* 调控表皮葡萄球菌的生长、药物敏感性、自溶能力和生物被膜的形成。

关键词: *VraSR*; *LrgAB*; 同源重组; 表皮葡萄球菌

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)
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82060380, 81660346) and the Young and Middle-aged Academic Leader Training Foundation of Yunnan Province (202305AC160038).

*Corresponding author. E-mail: wuyoucong@dali.edu.cn

Received: 2024-08-05; Accepted: 2024-11-15; Published online: 2024-11-19

Construction and characterization of $\Delta vraSR-lrgAB$ of *Staphylococcus epidermidis*

SHANG Shuangjie¹, CHEN Weiguo¹, ZHANG Xiaokui¹, ZHU Jianpeng¹, BAI Song¹, CHEN Xiaoting¹, WU Youcong^{1,2*}

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

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

Abstract: [Objective] To explore the role of *VraSR* in regulating the biological functions of *Staphylococcus epidermidis* via the *CidA-LrgAB* system. **[Methods]** The recombinant plasmid pKOR1- $\Delta lrgAB$ was constructed and then electroporated into SE1457 $\Delta vraSR$ to delete *lrgAB* from the genome of $\Delta vraSR$ by homologous recombination. The suspected mutant $\Delta vraSR-lrgAB$ was verified by PCR, RT-PCR, and sequencing. The growth, drug susceptibility, autolysis, and biofilm formation of $\Delta vraSR-lrgAB$ were determined. **[Results]** The *S. epidermidis* mutant $\Delta vraSR-lrgAB$ was successfully constructed. Compared with SE1457, $\Delta vraSR$, and $\Delta lrgAB$, $\Delta vraSR-lrgAB$ exhibited retarded growth, especially at 25 °C and 40 °C ($P < 0.001$), increased drug susceptibility ($P < 0.01$), enhanced autolysis ($P < 0.001$), and reduced biofilm formation ($P < 0.01$). **[Conclusion]** *VraSR* may regulate the growth, drug susceptibility, autolysis, and biofilm formation of *S. epidermidis* partly via the *LrgAB* system.

Keywords: *VraSR*; *LrgAB*; homologous recombination; *Staphylococcus epidermidis*

表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)是一种常见于人类皮肤表面的机会性病原菌,能在临床常用的医疗器械表层形成具有黏附性的生物被膜^[1],这种生物被膜不仅提高了表皮葡萄球菌对抗菌药物的耐药性,还帮助其逃避机体免疫系统的清除作用,最终引发持续性和反复性感染^[2]。

双组分信号转导系统(two-component signal transduction system, TCS)^[3]是原核生物中用于感知外部信号并执行适应性反应的一种调控机制。当细菌受到外部信号刺激时,该系统能将信号传递至细胞内部,进而调控一系列基因的表达^[4-6]。万古霉素耐药相关双组分系统(vancomycin resistance-associated regulatory system, *VraSR*)^[7]由 *VraS* 和 *VraR* 两种蛋白组成,其中

VraS 负责感知细胞壁的压力变化,并通过磷酸化作用激活反应调节蛋白 *VraR*,从而调控下游靶基因的表达,进而影响细菌的耐药性、毒力及生物被膜形成等特性^[8]。Wu 等^[9]研究发现,敲除 *vraSR* 后表皮葡萄球菌 SE1457 的药物敏感性增强、细胞壁变薄、自溶增强以及生物被膜形成降低。

葡萄球菌 *CidA-LrgAB* 系统是调节细菌程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)和溶解的关键元件。*CidA* 蛋白在结构与噬菌体 *Holin* 蛋白具有高度相似性^[10-12],其通过寡聚化过程诱导膜去极化,进而激活胞壁质水解酶,促进细菌的溶解。相比之下,*LrgAB* 则是通过抑制 *CidA* 的去极化来调控自溶过程和胞壁质水解酶的活性^[13]。此外,在蜡样芽胞杆菌(*Bacillus*

cereus)中, GapB 通过调控 LrgAB 的表达或活性, 参与细胞外 DNA 的释放和生物被膜的形成过程^[14]。

Belcheva 等^[15]研究发现, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) VraR 能够与下游靶基因的启动子区域结合, 其基因序列特征为 ACT(X)_nAGT 或 TGA(X)_nTCA, 其中 n 代表 1–3 个核苷酸。Wu 等^[9]研究发现, 在表皮葡萄球菌 SE1457 *lrgAB* 基因启动子区中存在 VraR 的结合基序。当敲除 *lrgAB* 后, 表皮葡萄球菌的药物敏感性增加, 自溶活性增强, 且生物被膜形成能力减弱(数据未发表)。因此, 推测 LrgAB 的表达可能受 VraSR 的调控, VraSR 通过 LrgAB 调控表皮葡萄球菌的生长、药物敏感性、自溶^[16]、生物被膜形成^[17]和 PCD^[11-12]等生物学过程。此前利用质粒同源重组技术^[18]已成功获得 Δ *vraSR* 敲除突变株, 在此基础上通过同源重组构建了表皮葡萄球菌 SE1457 的 Δ *vraSR-lrgAB* 敲除突变株^[19-20], 以探究 VraSR 通过 CidA-LrgAB 系统调控表皮葡萄球菌生物学表型的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

TSA 培养基、TSB 培养基、MH 琼脂培养基、20×PBS 缓冲液、结晶紫、Triton X-100, 北京索莱宝科技有限公司; 琼脂糖粉, Biowest 公司; Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、RNeasy Mini Kit、HiScript[®] III RT SuperMix 试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 2×Taq PCR Master Mix、DNA marker、限制性内切酶(*Xho* I、*Kpn* I)、质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 溶葡萄球菌酶、BP Clonase[™] II Enzyme Mix, 赛默飞世尔科技公司; 脱水四环

素(Atc)、万古霉素(Van)、氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、氯霉素(Cm)、杆菌肽(Bacitracin), 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.2 常规试剂配制

B₂ 培养基(g/L): 酵母提取物 25.0, 葡萄糖 5.0, 胰蛋白胨粉 10.0, K₂HPO₄ 1.0, NaCl 25.0, 去离子水定容到 1 L; 121 °C 灭菌 15 min。

0.2% Triton X-100 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2) (g/L): Tris 6.1, 去离子水定容到 1 L, 浓盐酸调节 pH 至 7.2 后加入 2 mL Triton X-100, 121 °C 灭菌 15 min。

Atc (mg/mL): 脱水四环素干粉 2.5, 溶解于 1 mL 灭菌超纯水, 0.22 μm 滤膜过滤除菌。终浓度为 2.5 mg/mL。Van、Amp、Kan、Cm 和 Bacitracin 终浓度分别为 25、50、50、50 和 50 mg/mL。

1.1.3 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 表皮葡萄球菌 SE1457 *vraSR* 敲除突变株(Δ *vraSR*)、*altE* 敲除突变株(Δ *altE*)、*icaC* 敲除突变株(Δ *icaC*)、SE35984、大肠杆菌 DC10B、穿梭质粒 pKOR1 均由本实验室保存。

1.2 *lrgAB* 基因上、下游同源臂 PCR 扩增

以表皮葡萄球菌 SE1457 全基因组 DNA 为扩增模板, 利用引物 *lrgAB*-U-attB1-F/*lrgAB*-U-R (表 1) 扩增 *lrgAB* 基因上游同源臂(US); 利用引物 *lrgAB*-D-F/*lrgAB*-D-attB2-R 扩增 *lrgAB* 基因下游同源臂(DS), 鉴定正确后切胶回收。PCR 反应体系: 模板 DNA (100 ng/μL) 2 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, dNTP Mix (10 mmol/L) 1 μL, 2×Phanta Max Buffer 25 μL, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL, 三蒸水补足至 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min;

94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。

以 US 和 DS 为模板, 重叠 PCR 扩增 US-DS 片段, 鉴定成功后回收纯化^[21]。PCR 反应体系: attB1-DS、US-attB2 模板各 2 μL, 引物 *lrgAB*-U-attB1-F/*lrgAB*-D-attB2-R (10 μmol/L) 各 0.5 μL, dNTP Mix (10 mmol/L) 0.5 μL, 2× Phanta Max Buffer 10 μL, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL, 三蒸水补足至 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.3 同源重组质粒 pKOR1-Δ*lrgAB* 的构建

BP 反应体系^[21]: DS-US PCR 片段(带有 attB 位点, 15–150 ng) 1 μL, pKOR1 质粒(带有 attP 位点, 100–150 ng) 1 μL, BP Clonase™ II Enzyme Mix 2 μL, TE-buffer (pH 8.0) 补足至 10 μL。混匀后 25 °C 孵育 1 h。加入 1 μL 蛋白酶 K, 37 °C 水浴 10 min, 终止反应。取 2–5 μL BP 反应液转入 DH5α 感受态细胞中, 冰浴 30 min, 42 °C 热激 90 s 后冰浴 5 min。加入 1 mL LB 培养液, 37 °C、220 r/min 摇菌 1 h, 取 100 μL 涂板, 鉴定阳性克隆。

表1 表皮葡萄球菌SE1457 Δ*vraSR-lrgAB*突变株构建与鉴定所用引物

Table 1 Primers used in the construction and verification of the SE1457 Δ*vraSR-lrgAB* mutant

Primers name	Primer sequences (5'→3')	Location (bp)	Restriction enzyme	Product size (bp)
Construction of <i>vraSR-lrgAB</i> knockout mutant				
<i>lrgAB</i> -U-attB1-F	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTTCT</u> CAATCAGGCACG	2 046 064–2 046 081	attB1	978
<i>lrgAB</i> -U-R	ACTGCTACAACAATAACGCCACGAGATGCGTTTGTT CC	2 047 035–2 047 052		978
<i>lrgAB</i> -D-F	TTGGAACAAACGCATCTCGTGGCGTTATTGTTGTAG CA	2 048 137–2 048 154		1 072
<i>lrgAB</i> -D-attB2-R	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATGAA</u> GCGGATGGAAAA	2 049 145–2 049 162	attB2	1 072
<i>vraSR</i> -U-F	TTCAACACGGTATAGGAG	1 486 676–1 486 693		2 359
<i>vraSR</i> -D-R	TTACTAGGGTCCTTTGCA	1 484 335–1 484 352		2 359
<i>lrgAB</i> -U-F	ATGAAACGACCGAAACAC	2 046 675–2 046 692		886
<i>lrgAB</i> -D-R	AAAGGTATGGGAATGACG	2 048 687–2 048 704		886
Identification of <i>vraSR-lrgAB</i> knockout mutant by RT-PCR				
RT- <i>gyrB</i> -F	CCTACAGATGGATTCTCAT	2 610 611–2 610 629		148
RT- <i>gyrB</i> -R	TAACAGCAGTCGTATCAA	2 610 741–2 610 758		148
RT- <i>vraSR</i> -F	GTTAAGGCACCATTGAATAAG	1 485 382–1 485 402		133
RT- <i>vraSR</i> -R	TAACAGCAGTCGTATCAA	1 485 270–1 485 293		133
RT- <i>lrgAB</i> -F	TCAACAAGCATTAACGAT	2 047 101–2 047 118		194
RT- <i>lrgAB</i> -R	GTACGAATAGGAATCCAATA	2 047 275–2 047 294		194

F: 正向引物; R: 反向引物; 下划线: attB位点。

F: Forward primer; R: Reverse primer; Underlines: attB sites.

1.4 表皮葡萄球菌 Δ *vraSR* 突变株感受态细胞制备

选取单个葡萄球菌菌落, 振荡培养至对数生长期(OD_{600} 值为 0.5), 冰浴 10 min。随后, 在 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。使用预冷的、与离心前相同体积的 0.5 mol/L 蔗糖溶液轻柔地重悬细胞, 并在冰上静置 15 min。之后, 再次在 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 此步重复 2 次。向洗涤后的细胞中加入 1 mL 预冷的 0.5 mol/L 蔗糖溶液, 缓慢重悬细胞, 在冰上静置 10 min 后, 分装成每支 100 μ L, 并置于 -80 °C 保存备用。

1.5 重组质粒 pKOR1- Δ *lrgAB* 电击转化、突变株的筛选

重组质粒 pKOR1- Δ *lrgAB* 热激转化至大肠杆菌 DC10B 中进行修饰, 抽提质粒并采用电击转化法^[22] (电压 2.5 kV, 电容 25 μ F, 电阻 100 Ω) 将其导入表皮葡萄球菌 SE1457 Δ *vraSR* 的感受态细胞中。电击后, 立即加入 37 °C 预热的 B₂ 培养基(500 μ L), 并在 37 °C、220 r/min 培养 1 h。接着, 取 100 μ L 细菌悬液均匀涂布于 TSA 平板(含 Cm 10 μ g/mL)上, 30 °C 培养过夜。

挑取阳性克隆转种于 5 mL TSB 培养基(含 Cm 10 μ g/mL)上, 43 °C 培养过夜。以 1:200 的比例转接到 5 mL 新鲜的 TSB 培养基中, 在 30 °C、200 r/min 振荡培养过夜。用纯水 1:10 000 的比例稀释后, 取 100 μ L 稀释液均匀涂布于 TSA 平板(含 Atc 50 ng/mL)上, 并在 30 °C、200 r/min 培养过夜。在无抗生素的 TSA 平板上生长, 但在含有 Cm 的 TSA 平板上不生长的菌落, 初步判定为 Δ *vraSR-lrgAB* 疑似突变株。

1.6 表皮葡萄球菌 Δ *lrgAB-vraSR* 突变株的鉴定

提取 Δ *vraSR-lrgAB* 疑似突变株 DNA, 利用引

物 *vraSR-U-F/vraSR-D-R* 和 *lrgAB-U-F/lrgAB-D-R* 进行 PCR 检测, 以野生株 SE1457 作为对照。利用 RNeasy Mini Kit 提取 SE1457 及其同源性突变株的 RNA, 用 HiScript[®] III RT SuperMix 试剂盒逆转录为 cDNA。将 cDNA 作为模板进行 RT-PCR 扩增。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 48 °C 10 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.7 表皮葡萄球菌生长曲线测定

将过夜培养的细菌用 PBS 调整至 OD_{600} 值为 1.0, 用 TSB 培养基 1:200 稀释后加入 96 孔培养板(200 μ L/孔, 3 复孔), 置于微生物生长曲线检测仪检测。分别于 25、37、40 °C 条件下 200 r/min 振荡培养 12 h, 每隔 1 h 检测 1 次吸光度(OD_{600}), 实验重复 3 次。

1.8 表皮葡萄球菌药物敏感性检测

依据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)指导原则^[23], 选用试管稀释法测定表皮葡萄球菌药物敏感性。过夜培养的细菌以 1:200 的比例转接于 TSB 培养基中, 在 37 °C、220 r/min 培养至对数生长期, 将菌液浓度调整至 0.5 麦氏单位(1.5×10^8 CFU/mL), 接着按照 1:200 的比例加入 2 mL 含不同梯度浓度抗生素的 MH 培养基中, 继续在 37 °C 培养 16–24 h。肉眼观察试管中细菌生长情况, 以能够完全抑制细菌生长的最低抑菌药物浓度为该待测菌对该抗菌药物的 MIC。实验设立了空白对照与生长对照, 并且重复 3 次。

1.9 表皮葡萄球菌自溶能力测定

表皮葡萄球菌菌株的自溶试验参照 Brunskill 等^[24]描述的方法并作适当修改。过夜培养的细菌以 1:200 的比例接种于 TSB 培养基中, 在 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 值约为 0.6–0.8, 随后 6 000 \times g 离心 10 min 收集菌体,

用预冷 PBS 洗涤 2 次。之后, 用 Triton X-100 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2)重悬并调至 OD_{600} 值为 1.0, 将重悬后的菌液加入 96 孔培养板中(200 μ L/孔, 3 复孔), 在 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养, 每隔 30 min 使用分光光度计检测 1 次 OD_{600} 值, 持续检测 6 h。以表皮葡萄球菌 $\Delta attE$ 突变株作为阴性对照, 实验重复 3 次。

1.10 表皮葡萄球菌生物被膜形成半定量检测

通过半定量平板法测定表皮葡萄球菌菌株在体外形成生物膜的能力^[25]。将过夜菌以 1:200 的比例稀释于 TSB 培养基中, 加入 96 孔培养板(200 μ L/孔, 3 复孔), 在 37 $^{\circ}$ C 分别培养 6、12、24、48 h。培养结束后, 弃去上清, 用 PBS 清洗 96 孔培养板。接着, 用甲醇固定 15 min 以及 2% 结晶紫染色 30 min, 流水缓慢冲洗, 待孔板自然干燥后测定其在 570 nm 波长下的吸光度值(OD_{570})。表皮葡萄球菌 SE35984 和 $\Delta icaC$ 突变株分别为生物被膜形成阳性和阴性对照, 实验重复 3 次。

1.11 统计分析

生长曲线的测定、药物敏感性实验、自溶实验以及生物被膜形成实验的数据均使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析处理。误差线表示 3 次重复实验结果的标准误差, 其中 P 值于评估数据的统计学显著性。

2 结果与分析

2.1 SE1457 *lrgAB* 因 US-DS 同源臂 PCR 扩增

以 SE1457 基因组 DNA 为模板, *lrgAB*-U-attB1-F/*lrgAB*-U-R 为引物获得 978 bp PCR 片段(US); *lrgAB*-D-F/*lrgAB*-D-attB2-R 为引物获得 1 072 bp PCR 片段(DS)(图 1A)。以上述 PCR 产

物为模板, *lrgAB*-U-attB1-F/*lrgAB*-D-attB2-R 为引物进行 PCR 扩增, 获得 *lrgAB* 基因上、下游同源臂 attB1-DS-US-attB2 片段, 大小为 2 050 bp(图 1B)。

2.2 重组质粒 pKOR1- Δ *lrgAB* 的构建及鉴定

基于表皮葡萄球菌 SE1457 基因组序列, 在 *lrgAB* 基因上游和下游区域设计特异性引物, 用以构建同源序列, 进而在表皮葡萄球菌 $\Delta vraSR$ 突变株的基础上进一步敲除 *lrgAB* 基因(图 2A)。将 attB1-DS-US-attB2 片段与 pKOR1 质粒进行 BP 反应, 随后转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 提取重组质粒进行鉴定。利用 *lrgAB*-U-attB1-F/*lrgAB*-D-attB2-R 引物进行 PCR 扩增, 结果观察到大小为 2 050 bp 的条带(图 2B)。用 *Kpn* I 进行单酶切鉴定, 可见大小为 12 080 bp 的条带; 同时, 用 *Xho* I 和 *Kpn* I 进行双酶切鉴定, 观察到 2 条大小分别为 10 030 bp 和 2 050 bp 的条带(图 2C)。将鉴定正确的重组质粒 pKOR1- Δ *lrgAB* 分别转入大肠杆菌 DC10B 和 $\Delta vraSR$ 突变株中进行筛选。

2.3 表皮葡萄球菌 $\Delta vraSR$ -*lrgAB* 突变株鉴定

抽提 $\Delta vraSR$ -*lrgAB* 疑似突变株基因组 DNA 作为模板(SE1457 野生株作为对照), 使用引物 *vraSR*-U-F/*vraSR*-D-R 进行 PCR 扩增。 $\Delta vraSR$ -*lrgAB* 疑似突变株可见 683 bp 条带, 而 SE1457 野生株则呈现 2 359 bp 的条带, 二者相差 1 676 bp (*vraSR* 基因缺失)(图 3A)。使用引物 *lrgAB*-U-F/*lrgAB*-D-R 进行 PCR 检测, $\Delta vraSR$ -*lrgAB* 疑似突变株可见 886 bp 条带, 而以 SE1457 DNA 为模板可见 2 050 bp 条带, 二者相差 1 164 bp (*lrgAB* 基因缺失)(图 3B)。

RT-PCR 检测显示, SE1457 野生株可见 148、133 和 137 bp 条带, 提示 SE1457 中 *vraSR*

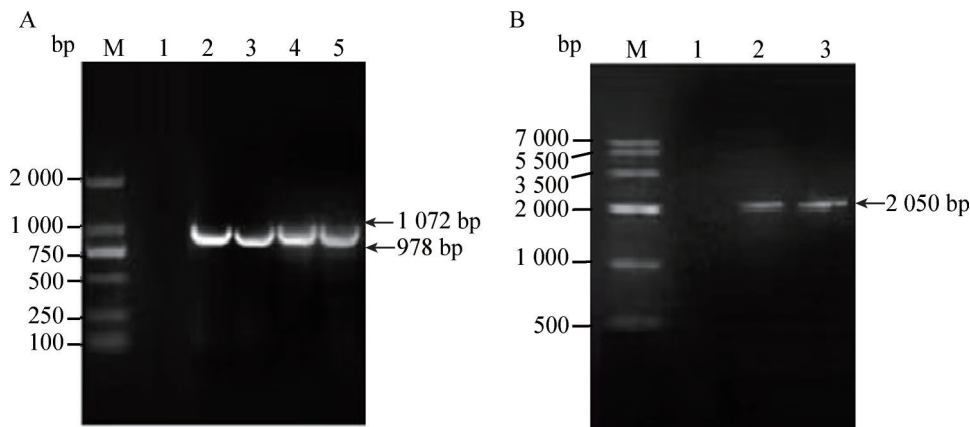


图1 表皮葡萄球菌SE1457 *lrgAB*基因上、下游同源臂PCR扩增。A: *lrgAB*基因上、下游同源臂PCR扩增。泳道M: DL2000 DNA Marker; 泳道1: 以蒸馏水为模板(空白对照); 泳道2、3: 以SE1457为模板, 扩增*lrgAB*基因US片段; 泳道4、5: 以SE1457为模板, 扩增*lrgAB*基因DS片段。B: *lrgAB*基因上、下游同源臂片段(attB1-DS-US-attB2) PCR扩增。泳道M: DL7000 DNA Marker; 泳道1: 以蒸馏水为模板(空白对照); 泳道2、3: 以US和DS为模板, PCR扩增上、下游同源臂片段。

Figure 1 PCR amplification of the upstream and downstream region flanking *lrgAB* gene. A: PCR amplification of the upstream and downstream region flanking *lrgAB* gene. Lane M: DL2000 DNA Marker; Lane 1: Distilled water as template (Blank control); Lanes 2, 3: SE1457 genomic DNA as template to amplify the US fragments flanking *lrgAB* gene; Lanes 4, 5: SE1457 genomic DNA as template to amplify the DS fragments flanking *lrgAB* gene. B: PCR amplification of US-DS homology arm fragments (attB1-DS-US-attB2) of the *lrgAB* gene. Lane M: DL7000 DNA Marker; Lane 1: Distilled water as template (Blank control); Lanes 2, 3: US plus DS as templates, PCR amplification of US-DS fragments.

和 *lrgAB* 基因均表达(*gyrB* 为内参基因), 而 Δ *vraSR* 突变株中未见 *vraSR* 基因表达, Δ *lrgAB* 突变株则未见 *lrgAB* 基因表达, Δ *vraSR-lrgAB* 突变株中 *vraSR* 和 *lrgAB* 均未表达(图 3C)。

2.4 表皮葡萄球菌 SE1457 Δ *vraSR-lrgAB* 突变株生长减慢

在 37 °C 的培养条件下, 敲除 *vraSR* 或 *lrgAB* 对表皮葡萄球菌 SE1457 生长无影响, 而 Δ *vraSR-lrgAB* 突变株较 SE1457、 Δ *vraSR* 和 Δ *lrgAB* 生长均减慢。SE1457、 Δ *vraSR* 和 Δ *lrgAB* 培养约 6 h 生长进入对数期(OD_{600} 值为 1.0), 而 Δ *vraSR-lrgAB* 突变株则需要 8 h。 Δ *vraSR-lrgAB* 突变株生长迟缓现象在低温(25 °C)和高温(40 °C)条件下更为显著(图 4)。

2.5 表皮葡萄球菌 SE1457 Δ *vraSR-lrgAB* 突变株药物敏感性增强

表皮葡萄球菌的药物敏感性参照试管稀释法进行检测(表 2)。结果显示, 敲除 *vraSR* 或 *lrgAB* 后, 表皮葡萄球菌对万古霉素及氨苄青霉素敏感性提高了约 1-2 倍, 对杆菌肽的敏感性分别提升了 32 倍和 2 倍, 然而, 对氯霉素、卡那霉素以及环丙沙星的敏感性并未发生显著变化。 Δ *vraSR-lrgAB* 突变株较于 SE1457、 Δ *vraSR* 和 Δ *lrgAB*, 对万古霉素、氨苄青霉素以及杆菌肽的敏感性均增强($P < 0.01$)。与 Δ *vraSR* 和 Δ *lrgAB* 突变株相比, Δ *vraSR-lrgAB* 对万古霉素及氨苄青霉素的敏感性提高 2 倍, 而对氯霉素、卡那霉素和环丙沙星的药物敏感性未发生显著变化; Δ *vraSR-lrgAB* 突变

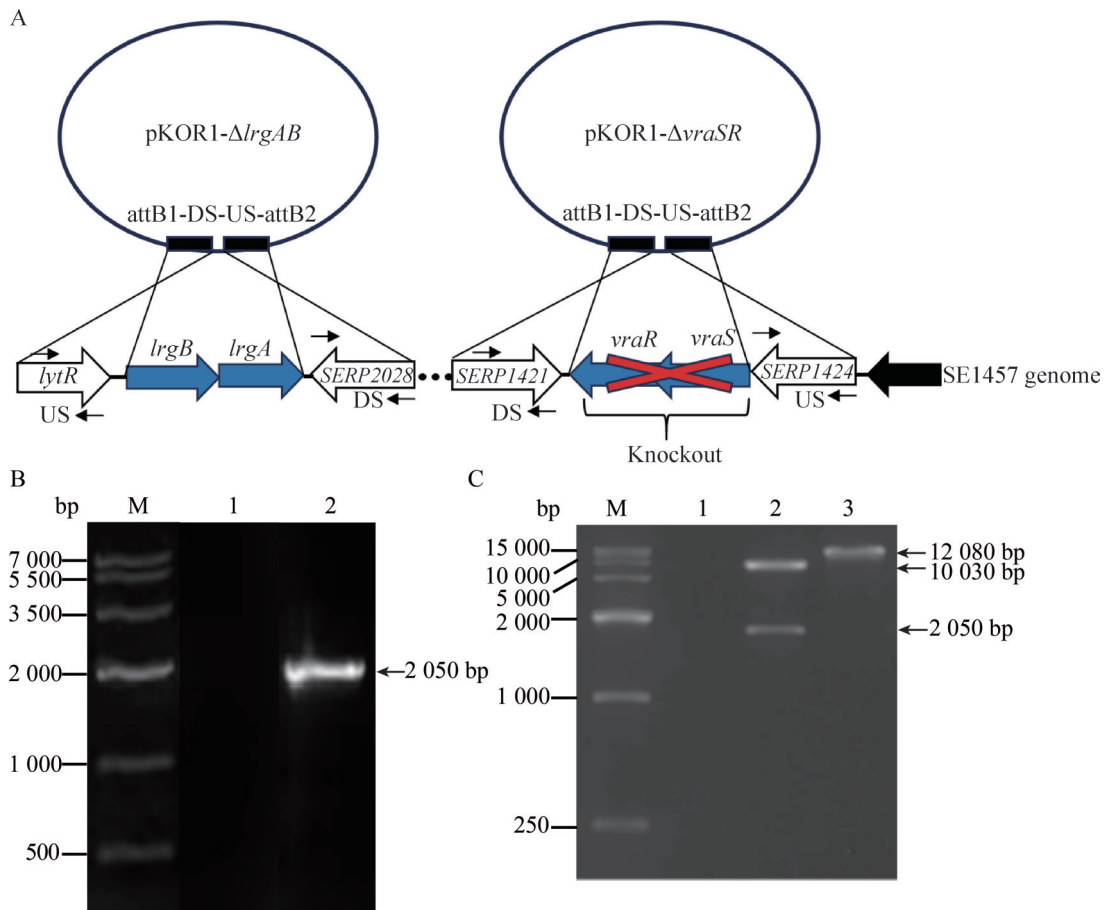


图2 重组质粒pKOR1- Δ lrgAB的构建及鉴定。A: 表皮葡萄球菌SE1457基因组。US: 上游同源臂; DS: 下游同源臂。B: 重组质粒pKOR1- Δ lrgAB的PCR鉴定。泳道M: DL7000 DNA Marker; 泳道1: 空白对照; 泳道2: 以重组质粒DNA为模板的PCR鉴定。C: 重组质粒pKOR1- Δ lrgAB酶切鉴定。泳道M: DL15000 DNA Marker; 泳道1: 空白对照; 泳道2: pKOR1- Δ lrgAB重组质粒经*Xho* I/*Kpn* I双酶切鉴定; 泳道3: pKOR1- Δ lrgAB重组质粒经*Kpn* I单酶切鉴定。

Figure 2 Construction and verification of recombinant plasmid pKOR1- Δ lrgAB. A: SE1457 genome. US: Up stream; DS: Down stream. B: Identification of the recombinant plasmid pKOR1- Δ lrgAB using PCR. Lane M: DL7000 DNA Marker; Lane 1: Blank control; Lane 2: PCR identification using recombinant plasmid DNA as template. C: Verification of recombinant plasmid pKOR1- Δ lrgAB using restriction enzyme digestion. Lane M: DL15000 DNA Marker; Lane 1: Blank control; Lane 2: The recombinant plasmid pKOR1- Δ lrgAB was digested with *Xho* I and *Kpn* I; Lane 3: The recombinant plasmid pKOR1- Δ lrgAB was digested with *Kpn* I.

株对杆菌肽的敏感性较 Δ vraSR 和 Δ lrgAB 突变株分别增强了 2 倍和 32 倍。

2.6 表皮葡萄球菌 SE1457 Δ vraSR-*lrgAB* 突变株自溶增强

Triton X-100 诱导的自溶结果显示, 敲除

vraSR 或 *lrgAB* 基因, 表皮葡萄球菌 SE1457 的自溶能力增强约 2 倍。SE1457、 Δ vraSR、 Δ lrgAB 和 Δ vraSR-*lrgAB* 菌株在 Triton X-100 诱导 3 h 条件下, 自溶率分别为 19.3%、32.0%、31.7% 和 53.8%。 Δ vraSR-*lrgAB* 突变株自溶能力较 Δ vraSR

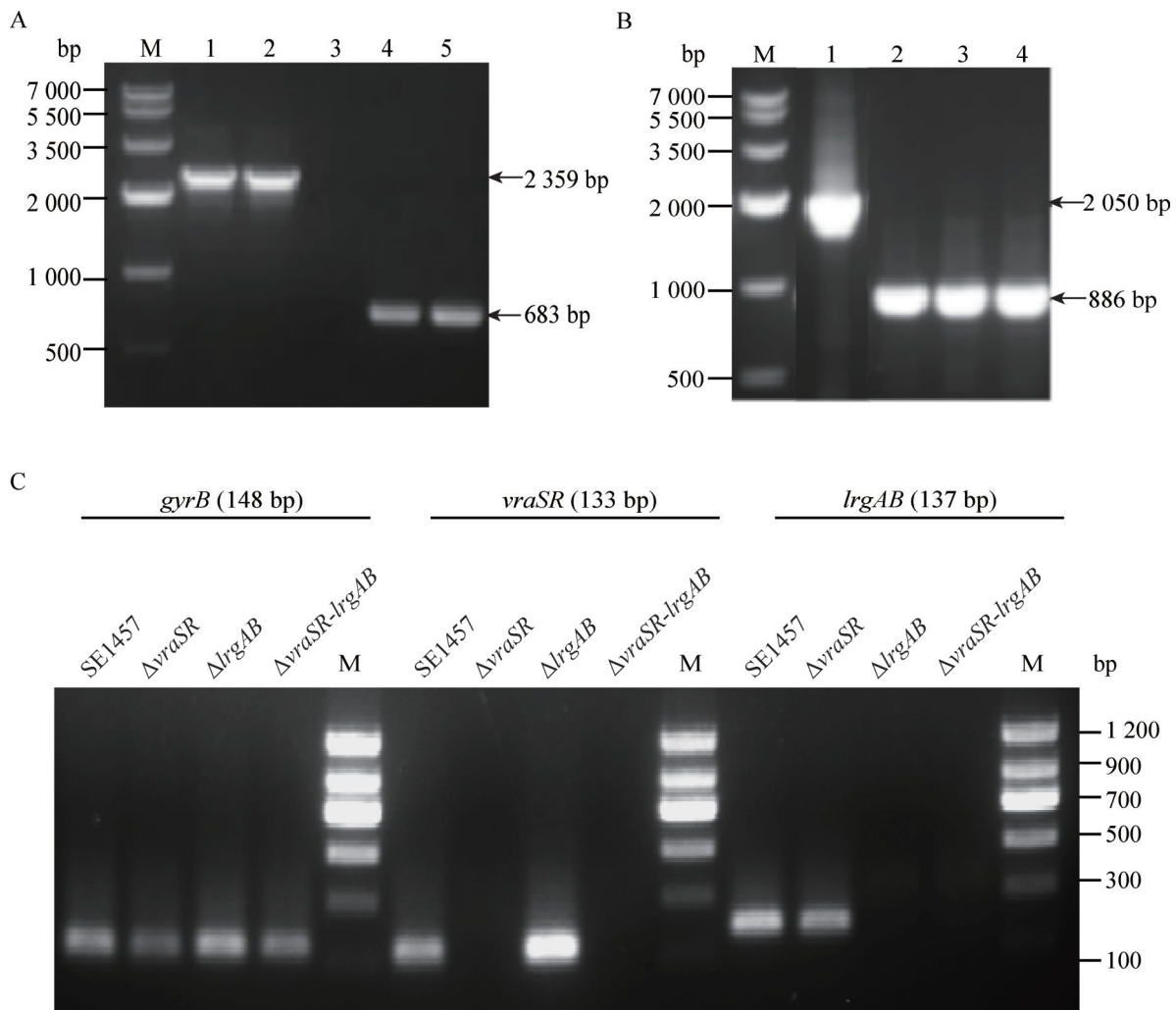


图3 表皮葡萄球菌 $\Delta vrsR-lrgAB$ 突变株鉴定。A: 以 $vraSR$ -U-F/ $vraSR$ -D-R为引物的PCR鉴定。泳道M: DL7000 DNA Marker; 泳道1、2: 以SE1457基因组DNA为模板(阳性对照); 泳道3: 蒸馏水为模板(空白对照); 泳道4、5: 以 $\Delta vrsR-lrgAB$ 突变株基因组DNA为模板。B: 以 $lrgAB$ -U-F/ $lrgAB$ -D-R为引物的PCR鉴定。泳道M: DL7000 DNA Marker; 泳道1: 以SE1457基因组DNA为模板(阳性对照); 泳道2-4: 以 $\Delta vrsR-lrgAB$ 突变株基因组DNA为模板。C: SE1457 $\Delta vrsR-lrgAB$ 突变株RT-PCR鉴定(测定SE1457、 $\Delta vrsR$ 、 $\Delta lrgAB$ 及 $\Delta vrsR-lrgAB$ 突变株中 $vraSR$ 基因和 $lrgAB$ 基因的转录水平, $gyrB$ 为管家基因, 泳道M: DL1200 DNA Marker)。

Figure 3 Verification of $\Delta vrsR-lrgAB$ mutant. A: PCR identification of $\Delta vrsR-lrgAB$ mutant using $vraSR$ -U-F/ $vraSR$ -D-R as the primers. Lane M: DL7000 DNA Marker; Lanes 1, 2: SE1457 genomic DNA as template (Positive control); Lane 3: Distilled water as template (Blank control); Lanes 4, 5: $\Delta vrsR-lrgAB$ mutant genomic DNA as template. B: PCR identification of $\Delta vrsR-lrgAB$ mutant using $lrgAB$ -U-F/ $lrgAB$ -D-R as primers. Lane M: DL7000 DNA Marker; Lane 1: SE1457 genomic DNA as template (Positive control); Lanes 2-4: $\Delta vrsR-lrgAB$ mutant genomic DNA as template. C: Verification of $\Delta vrsR-lrgAB$ mutant using RT-PCR (Transcriptional levels of $vraSR$ and $lrgAB$ in SE1457, $\Delta vrsR$, $\Delta lrgAB$ and $\Delta vrsR-lrgAB$ mutant were detected, $gyrB$ was designated as housekeeping gene, Lane M: DL1200 DNA Marker).

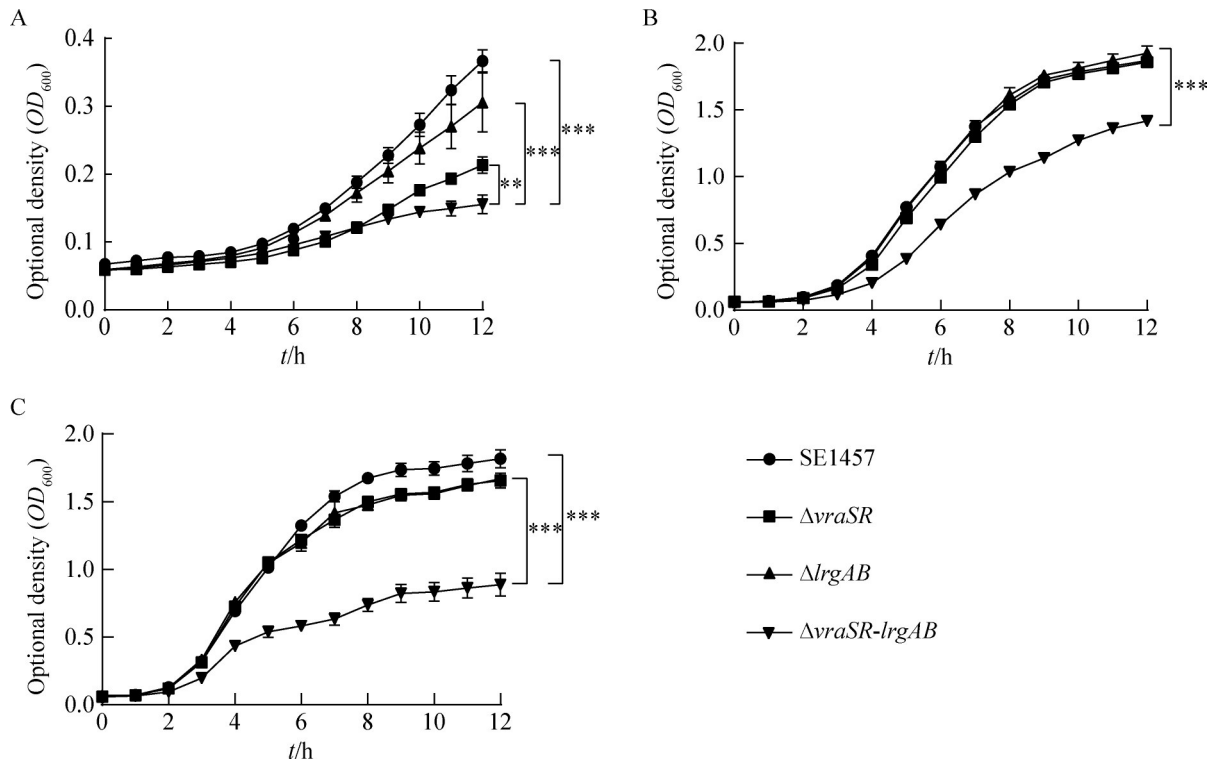


图4 表皮葡萄球菌SE1457及其同源性突变株生长曲线。过夜培养物调整 OD_{600} 至1.0, 1:200的比例稀释后加入96孔培养板(3复孔), 分别置于25 °C (A)、37 °C (B)和40 °C (C)条件下培养。**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

Figure 4 Growth curves of SE1457 and its isogenic mutants. The overnight cultures were adjusted to OD_{600} of 1.0, diluted 1:200 and added to 96-well culture plates in triplicate. The plates were incubated at 25 °C (A), 37 °C (B) and 40 °C (C), respectively. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

和 $\Delta lrgAB$ 突变株均明显增强。 $\Delta atlE$ 突变株(对照株)自溶曲线较平稳(图 5)。

2.7 表皮葡萄球菌 SE1457 $\Delta vraSR$ - $lrgAB$ 突变株生物被膜形成降低

依据微量平板定量法对表皮葡萄球菌生物被膜形成能力进行测定。野生株 SE1457 在 96 孔板底部展现出紧密且结构完整的生物被膜, 其形成量与阳性对照株 SE35984 相当; 相比之下, $\Delta vraSR$ 和 $\Delta lrgAB$ 突变株生物被膜形成能力明显减弱, $\Delta vraSR$ - $lrgAB$ 突变株生物被膜的形成能力和 $\Delta lrgAB$ 突变株以及阴性对照 $\Delta icaC$ 突变株接近(图 6A)。通过结晶紫染色并进行 OD_{570} 值定量检测, $\Delta vraSR$ 突变株生物被膜形成量约

为野生株 SE1457 的 30%–50%, $\Delta lrgAB$ 生物被膜形成量为野生株 SE1457 的 20%–30%, 而 $\Delta vraSR$ - $lrgAB$ 突变株生物被膜形成量与 $\Delta lrgAB$ 突变株相似(图 6B)。

3 讨论与结论

VraSR 能感知环境中的压力因子(如抗生素、SDS 等)变化, 通过调控一系列下游靶基因的转录, 影响葡萄球菌的药物敏感性、细胞壁合成、细菌的程序性细胞死亡等生物学表型。为进一步明确表皮葡萄球菌 VraSR 调控通路中 LrgAB 的生物学作用, 本研究利用同源重组技术在 $\Delta vraSR$ 基础上进一步敲除 $lrgAB$ 基因, 获得表

表2 表皮葡萄球菌SE1457及其同源突变株的药物敏感性分析

Table 2 Susceptibility of SE1457 and its isogenic mutants

Strains	MIC (μg/mL)					
	Van	Amp	Cm	Kan	Cip	Bacitracin
SE1457	4	1	4	16	0.25	64
$\Delta vraSR$	1-2	0.5	4	16	0.25	2
$\Delta lrgAB$	2	0.5	4	16	0.25	32
$\Delta vraSR-lrgAB$	1	0.25	4	16	0.25	1

Van: 万古霉素; Amp: 氨苄青霉素; Cm: 氯霉素; Kan: 卡那霉素; Cip: 环丙沙星; Bacitracin: 杆菌肽。实验均重复3次。

Van: Vancomycin; Amp: Ampicillin; Cm: Chloroamphenicol; Kan: Kanamycin; Cip: Ciprofloxacin. The experiment was repeated three times.

表皮葡萄球菌 SE1457 $\Delta vraSR-lrgAB$ 突变株。

在培养环境以及菌株生长状态相同的情况下, 单一敲除 *vraSR* 和 *lrgAB* 均不影响表皮葡萄球菌 SE1457 的生长, 排除了单一基因缺失对表皮葡萄球菌生长特性的影响。然而, 同时敲除两组基因后, 表皮葡萄球菌 SE1457 生长迟缓, 在高温(40 °C)和低温(25 °C)条件下生长迟缓更为

显著。可能原因有 2 点: (1) 与生长代谢相关基因下调有关; (2) 与细胞壁变薄抵抗力降低有关。Wu 等研究发现, 敲除 *vraSR* 后表皮葡萄球菌 SE1457 的多个代谢相关基因转录水平下调(如 *gntPKR*、*glpFKD*、*sucCD*、*manA* 等)(包括 *lrgAB* 下调), 细胞壁孔蛋白相关基因(*cidA*)上调^[9]。同样, 敲除 *lrgAB* 后多个代谢相关基因(如 *gntK*、*pyc*、*pflA*、*serp1025*、*sdhB* 等)转录水平下调。当 *vraSR-lrgAB* 两组操纵子同时敲除后, *VraSR* 与代谢相关的调控通路缺失, 对表皮葡萄球菌的生长代谢影响较大, 尤其是细胞壁的合成, 因而出现生长滞后、对环境胁迫(高温/低温)抵抗力降低的现象。不同的研究报道, 金黄色葡萄球菌 *VraSR* 的过表达能够提升细胞壁刺激因子的转录水平, 进而促使细胞壁结构增厚, 并伴随生长速度减缓^[26]。

与金黄色葡萄球菌的调控机制有所差异, 表皮葡萄球菌 *VraSR* 并不直接作用于耐药基因的转录以改变药物敏感性, 而是通过对糖类和氨基酸代谢的调节, 间接影响细胞壁的合成过程, 这一调控方式进一步影响细菌对药物的敏感性及其应对环境胁迫因子的抵抗力^[9]。表皮葡

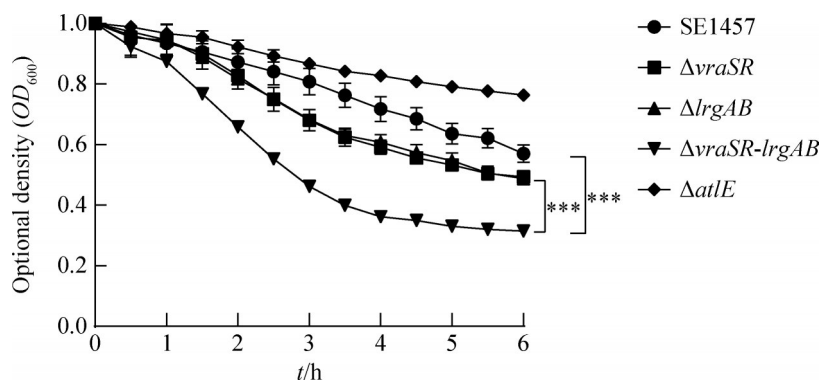


图5 表皮葡萄球菌SE1457 $\Delta vraSR-lrgAB$ 突变株自溶率检测。过夜培养物培养至对数期, 用0.2% Triton X-100缓冲溶液重悬。每30 min检测1次吸光度(OD_{600}) (***: $P < 0.001$)。

Figure 5 Detection of autolysis rate of SE1457 $\Delta vraSR-lrgAB$ mutant. Overnight cultures were grown to logarithmic phase and resuspend with 0.2% Triton X-100 buffer solution. The OD_{600} of the bacterial suspension was measured every 30 min (***: $P < 0.001$).

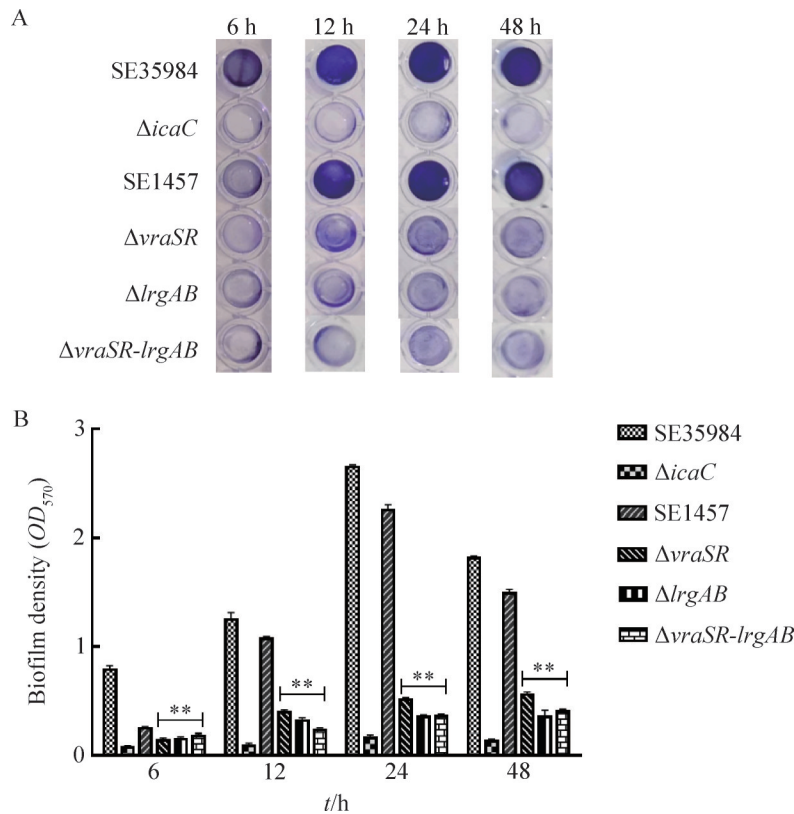


图6 表皮葡萄球菌SE1457 $\Delta vraSR-lrgAB$ 突变株生物被膜形成情况。A: 结晶紫染色后肉眼观察生物被膜形成; B: 吸光度值(OD_{570})检测生物被膜形成量(**: $P < 0.01$)。

Figure 6 The biofilm formation of SE1457 $\Delta vraSR-lrgAB$ mutant. A: The formation of biofilm was observed by the naked eye after crystal violet staining; B: The optical density (OD_{570}) was measured to assay biofilm formation (**: $P < 0.01$).

萄球菌 SE1457 $\Delta vraSR$ 突变株展现出对靶向细胞壁类抗菌药物的敏感性升高, $\Delta lrgAB$ 突变株对这类抗生素敏感性也显著提升。RNA-Seq 结果显示, 敲除 $lrgAB$ 后, 表皮葡萄球菌 SE1457 中与 ABC 膜转运蛋白相关基因 (*serp1395*、*serp0291* 等) 以及耐药相关基因 (*serp2380*、*serp0844* 等) 转录水平下调, 提示 LrgAB 通过参与调控糖和氨基酸代谢过程, 对细胞壁的合成产生影响, 从而提高表皮葡萄球菌对靶向细胞壁药物的耐药性。本研究发现, SE1457 $\Delta vraSR-lrgAB$ 突变株对细菌细胞壁靶向药物(如万古霉素, 氨苄青霉素以及杆菌肽)的敏感性较 $\Delta vraSR$ 和 $\Delta lrgAB$ 突变株均增强, 而对作用于细菌蛋白

质的氯霉素、卡那霉素以及作用于细菌 DNA 解旋酶的环丙沙星, 其敏感性则无显著差异。这可能是因为 VraSR 和 LrgAB 联合作用, 通过代谢影响表皮葡萄球菌的药物敏感性, 两者对药物敏感性具有一定的协同作用。另外, *vraSR* 和 *lrgAB* 同时缺失导致自溶能力增强, 使细胞壁合成受到抑制, 这也是影响表皮葡萄球菌药物敏感性的原因之一, 提示 VraSR-LrgAB 调控通路在表皮葡萄球菌药物敏感性中的作用。此结果与金黄色葡萄球菌不同, 金黄色葡萄球菌 VraSR 通过直接调控耐药相关基因(如 *pbp2*、*sgtB* 和 *murZ*) 的转录影响细菌的药物敏感性^[27-28]。Berscheid 等^[26] 研究发现, 金黄色葡萄球菌

VraSR 能响应细胞壁胁迫因子反应, 通过正调控耐药相关基因表达影响细胞壁的厚度, 进而影响金黄色葡萄球菌的药物敏感性, VraSR 表达增加导致金黄色葡萄球菌对万古霉素、苯唑西林、壁霉素和达托霉素的敏感性降低。

与金黄色葡萄球菌相似, VraSR 和 LrgAB 通过影响胞壁质水解酶活性和细胞壁的完整性来调控表皮葡萄球菌自溶。自溶是细菌维护群体数量及结构的一种利它行为, 受多种因素的影响^[29]。肽聚糖和磷壁酸是葡萄球菌细胞壁的重要组分, 与细菌的自溶关系密切。Wu 等研究发现, $\Delta vraSR$ 突变株中参与肽聚糖合成的半乳糖代谢相关基因及产生磷壁酸的糖酵解和磷酸戊糖途径相关基因表达下调, 从而导致表皮葡萄球菌的细胞壁不完整, 自溶能力增强^[9]。此外, *vraSR* 突变株中与 PCD 相关的 *cidA* 转录水平显著上调, *lrgAB* 转录水平显著下调^[30]。高表达的 CidA 蛋白能够寡聚化于细胞膜上形成跨膜孔道(holin), 导致膜电位丧失(去极化), 并触发胞壁质水解酶的激活, 使细胞壁中的肽聚糖分解, 增加细菌裂解与死亡, 提示 VraSR 可能间接调控胞壁质水解酶活性, 进而影响表皮葡萄球菌的自溶能力。 $\Delta lrgAB$ 突变株自溶率较 SE1457 野生株显著升高, 并且磷壁酸 D-丙氨酸酯化相关基因(*dltA/C/D*)以及胞壁质水解酶合成相关基因(*serp2120*、*serp0422* 和 *serp2136* 等)转录水平显著上调, 而维持膜完整性相关基因(*serp0842*、*serp2187* 和 *serp1412* 等)显著下调, 从而使细胞壁完整性受到破坏。提示 LrgAB 通过参与调控磷壁酸与胞壁质水解酶活性影响表皮葡萄球菌的自溶。 $\Delta vraSR$ -*lrgAB* 突变株较单一突变株的自溶进一步增强, 这可能是上述 2 种机制共同作用的结果, 协同调控胞壁质水解酶的活性和细胞壁的完整性, 提示 VraSR-LrgAB 通路通过调控细胞壁相关水解酶活性影

响表皮葡萄球菌的自溶。此结果与 Groicher 等^[13]报道一致。

生物被膜的形成是表皮葡萄球菌致病的主要原因^[31-32]。研究表明, 表皮葡萄球菌 SE1457 $\Delta vraSR$ 突变株生物被膜形成能力减弱, 同时在浮游状态和生物被膜中观察到更多的死细菌^[9]。本研究进一步发现, $\Delta lrgAB$ 和 $\Delta vraSR$ -*lrgAB* 突变株生物被膜形成能力和 $\Delta icaC$ 突变株大致相同, 提示 VraSR 不仅通过 *ica* 途径调控表皮葡萄球菌生物被膜形成^[9], 还可能通过 LrgAB 影响表皮葡萄球菌的生物被膜形成。 $\Delta vraSR$ 突变株中死细菌增多可能与 *lrgAB* 下调, *cidA* 上调, 自溶增强有关。Dhar 等^[33]和 Shi 等^[34]的研究发现, 金黄色葡萄球菌的 *lrgB* 基因失活会降低生物被膜形成量, 并增强细胞外 DNA (eDNA) 的释放量。释放至细胞外的 eDNA 能够促进部分金黄色葡萄球菌的生物被膜形成能力^[35]。然而, 与这些研究结果部分不同的是, 本研究发现, 尽管 VraSR 和 LrgAB 单一突变或双突变株的自溶能力增强, eDNA 释放量增加, 但这并未促进突变株的生物被膜形成能力增强, 最终使表皮葡萄球菌 VraSR 和 LrgAB 调控生物被膜形成机制有所差异。进一步提示, 自溶后释放的 eDNA 并不能增加 $\Delta vraSR$ -*lrgAB* 突变株的生物被膜形成量, 而多糖细胞间黏附素 (polysaccharide intercellular adhesin, PIA) 在表皮葡萄球菌生物被膜形成中的作用强于 eDNA。VraSR 可以单独通过 *ica* 调控表皮葡萄球菌生物被膜形成, 或部分协同 LrgAB 调控表皮葡萄球菌的生物被膜形成。

此外, 前期研究发现单一将 *vraSR*^[9] 或 *lrgAB* (数据未发表) 基因分别回复至表皮葡萄球菌 $\Delta vraSR$ 或 $\Delta lrgAB$ 突变株中, 可以观察到表皮葡萄球菌的药物敏感性、自溶活性以及生物被膜的形成能力均与野生株 SE1457 相似, 提示 *vraSR* 或 *lrgAB* 基因的缺失影响表皮葡萄球菌的

药物敏感性、自溶以及生物被膜的形成能力。诚然，本研究未进一步做同时回复两组基因的 $\Delta vraSR-lrgAB$ (pCN51-*vraSR-lrgAB*) 互补株。

综上所述，本研究发现 *VraSR* 可能通过调控下游靶基因 *LrgAB* 的表达影响表皮葡萄球菌的生物学表型，*VraSR* 与 *LrgAB* 在调控表皮葡萄球菌环境胁迫(抗生素压力)、自溶活性以及生物被膜形成等方面可能具有协同作用。该研究为进一步探索 *VraSR-CidA-LrgAB* 调控通路作为防治葡萄球菌持续性感染的药靶提供了见解。

作者贡献声明

尚爽婕：实验操作、数据收集和处理、论文撰写和修改；陈卫国、张晓奎、朱健鹏、白松：实验操作、数据收集和处理；陈晓婷：提供技术支持；武有聪：研究构思和设计、论文审阅和修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] ORTEGA-PEÑA S, MARTÍNEZ-GARCÍA S, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ S, CANCINO-DIAZ ME, CANCINO-DIAZ JC. Overview of *Staphylococcus epidermidis* cell wall-anchored proteins: potential targets to inhibit biofilm formation[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(1): 771-784.
- [2] KLEINSCHMIDT S, HUYGENS F, FAOAGALI J, RATHNAYAKE IU, HAFNER LM. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia[J]. *Future Microbiology*, 2015, 10(11): 1859-1879.
- [3] RIGHETTI E, KAHRAMANOĞULLARI O. The inverse correlation between robustness and sensitivity to autoregulation in two-component systems[J]. *Mathematical Biosciences*, 2021, 341: 108706.
- [4] GOMES F, TEIXEIRA P, CERCA N, CERI H, OLIVEIRA R. Virulence gene expression by *Staphylococcus epidermidis* biofilm cells exposed to antibiotics[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2011, 17(2): 191-196.
- [5] TIERNEY AR, RATHER PN. Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance[J]. *Future Microbiology*, 2019, 14(6): 533-552.
- [6] 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]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(18): 12354-12364.
- [7] GAO CH, DAI YY, CHANG WJ, FANG C, WANG ZR, MA XL. *VraSR* has an important role in immune evasion of *Staphylococcus aureus* with low level vancomycin resistance[J]. *Microbes and Infection*, 2019, 21(8/9): 361-367.
- [8] SENGUPTA M, JAIN V, WILKINSON BJ, JAYASWAL RK. Chromatin immunoprecipitation identifies genes under direct *VraSR* regulation in *Staphylococcus aureus*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2012, 58(6): 703-708.
- [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] PATEL K, GOLEMI-KOTRA D. Signaling mechanism by the *Staphylococcus aureus* two-component system *LytSR*: role of acetyl phosphate in bypassing the cell membrane electrical potential sensor *LytS*[J]. *F1000 Research*, 2015, 4: 79.
- [11] ZHANG X, CHEN YH, YAN TL, WANG HJ, ZHANG RB, XU YR, HOU YJ, PENG Q, SONG FP. Cell death dependent on holins *LrgAB* repressed by a novel *ArsR* family regulator *CdsR*[J]. *Cell Death Discovery*, 2024, 10(1): 173.
- [12] ENDRES JL, CHAUDHARI SS, ZHANG XY, PRAHLAD J, WANG SQ, FOLEY LA, LUCA S, BOSE JL, THOMAS VC, BAYLES KW. The *Staphylococcus aureus* *CidA* and *LrgA* proteins are functional holins involved in the transport of by-products of carbohydrate metabolism[J]. *mBio*, 2021, 13(1): e0282721.
- [13] GROICHER KH, FIREK BA, FUJIMOTO DF, BAYLES KW. The *Staphylococcus aureus* *lrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(7): 1794-1801.
- [14] AHN SJ, HULL W, DESAI S, RICE KC, CULP D. Understanding *LrgAB* regulation of *Streptococcus mutans* metabolism[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 2119.
- [15] BELCHEVA A, VERMA V, GOLEMI-KOTRA D. DNA-binding activity of the vancomycin resistance associated regulator protein *VraR* and the role of phosphorylation in transcriptional regulation of the *vraSR* operon[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(24): 5592-5601.
- [16] CHEN XW, PENG Z, JI XM, ZHANG J. Reducing cellular autolysis of *Bacillus subtilis* to improve keratinase production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(10): 3106-3113.
- [17] XIANG BQ, LEI YJ, CHEN Y, ZHAO GQ, ZHOU YC, ZHOU YQ, HUANG YC, YE LH. Mechanistic study on the inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm by *agrC*-specific binding polypeptide[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2020, 8(6): 337.
- [18] 武有聪, 孟媛媛, 丁百兴, 韩海燕, 瞿滌, 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).
- [19] 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 XT, QIAN L, CHEN WG, SUN SZ, BAI ZK, ZHAO CJ, WU YC. Construction and biological phenotype characterization of *vraSR-srrAB* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3562-3574 (in Chinese).
- [20] WRIGHT WD, SHAH SS, HEYER WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(27): 10524-10535.
- [21] BAE T, SCHNEEWIND O. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection[J]. Plasmid, 2006, 55(1): 58-63.
- [22] GEHL J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research[J]. Acta Physiologica Scandinavica, 2003, 177(4): 437-447.
- [23] KATO Y, SUZUKI T, IDA T, MAEBASHI K. Genetic changes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: predominance of amino acid substitutions in *YvqF/VraSR*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65(1): 37-45.
- [24] BRUNSKILL EW, BAYLES KW. Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(3): 611-618.
- [25] CHRISTENSEN GD, SIMPSON WA, YOUNGER JJ, BADDOUR LM, BARRETT FF, MELTON DM, BEACHEY EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1985, 22(6): 996-1006.
- [26] BERSCHIED A, FRANÇOIS P, STRITTMATTER A, GOTTSCHALK G, SCHRENZEL J, SASS P, BIERBAUM G. Generation of a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) strain by two amino acid exchanges in *VraS*[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(12): 3190-3198.
- [27] KURODA M, KURODA H, OSHIMA T, TAKEUCHI F, MORI H, HIRAMATSU K. Two-component system *VraSR* positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*[J]. Molecular Microbiology, 2003, 49(3): 807-821.
- [28] LEVINGER O, BIKELS-GOSHEN T, LANDAU E, FICHMAN M, SHAPIRA R. Epigallocatechin gallate induces upregulation of the two-component *VraSR* system by evoking a cell wall stress response in *Staphylococcus aureus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(22): 7954-7959.
- [29] BOSE JL, LEHMAN MK, FEY PD, BAYLES KW. Contribution of the *Staphylococcus aureus* *Atl* AM and *GL* murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e42244.
- [30] 孙士正, 孟媛媛, 张维娜, 刁德睿, 陈晓婷, 武有聪. 表皮葡萄球菌 SE1457 与 *vraSR* 突变株转录组测序比较分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(11): 1241-1246.
- SUN SZ, MENG YY, ZHANG WN, DIAO DR, CHEN XT, WU YC. Comparison analysis on the transcriptome sequencing of *Staphylococcus epidermidis* SE1457 and its isogenic *vraSR* mutant strain[J]. Journal of Pathogen Biology, 2022, 17(11): 1241-1246 (in Chinese).
- [31] OTTO M. *Staphylococcus epidermidis*: a major player in bacterial sepsis? [J]. Future Microbiology, 2017, 12(12): 1031-1033.
- [32] ABEBE GM. The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination[J]. International Journal of Microbiology, 2020, 2020: 1705814.
- [33] DHAR S, KUMARI H, BALASUBRAMANIAN D, MATHEE K. Cell-wall recycling and synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*-their role in the development of resistance[J]. Journal of Medical Microbiology, 2018, 67(1): 1-21.
- [34] SHI YB, SUN JH. Current advance in the topological structure and function of holin encoded by bacteriophage lambda: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(2): 141-145.
- [35] YANG KX, WANG LS, CAO XH, GU ZR, ZHAO GW, RAN MQ, YAN YJ, YAN JY, XU L, GAO CH, YANG M. The origin, function, distribution, quantification, and research advances of extracellular DNA[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(22): 13690.