

母乳源表皮葡萄球菌比较基因组学

赵乾^{1,2,3,4}, 李伟程^{1,2,3,4}, 李瑜^{1,2,3,4}, 孙佳琦^{1,2,3,4}, 钟智^{1,2,3,4}, 张和平^{1,2,3,4*}

- 1 乳酸菌与发酵乳制品省部共建协同创新中心, 内蒙古 呼和浩特
- 2 内蒙古农业大学, 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特
- 3 农业农村部奶制品加工重点实验室, 内蒙古 呼和浩特
- 4 内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特

赵乾, 李伟程, 李瑜, 孙佳琦, 钟智, 张和平. 母乳源表皮葡萄球菌比较基因组学[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 2072-2090.

ZHAO Qian, LI Weicheng, LI Yu, SUN Jiaqi, ZHONG Zhi, ZHANG Heping. Comparative genomics of *Staphylococcus epidermidis* isolates from breast milk[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(5): 2072-2090.

摘要:【目的】表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)是一种凝固酶阴性、革兰氏染色阳性的球菌, 广泛存在于皮肤、母乳和血液等环境中。母乳中的细菌对婴幼儿肠道初始菌群的建立及免疫力的提高具有至关重要的作用, 本研究通过比较基因组学分析, 以期了解母乳源表皮葡萄球菌的遗传多样性和功能基因特征。【方法】使用 Illumina NovaSeq 高通量测序平台, 对前期分离自健康母乳中的 110 株表皮葡萄球菌进行基因组测序, 并结合 NCBI 已公开的 263 株皮肤源、血液源和母乳源表皮葡萄球菌的基因组序列进行比较基因组学分析。【结果】373 株表皮葡萄球菌的基因组大小为(2.50±0.33) Mb, G+C 含量为(32.0±0.1)%, 编码序列(coding sequence, CDs)数量为(2 331±368)个。不同分离源的菌株在基因组大小和 CDs 数量上均存在显著差异($P<0.05$), 其中血液源菌株的基因组较大且 CDs 数量较多。系统发育树结果显示, 表皮葡萄球菌在系统发育树上呈现一定的分离源聚类趋势, 体内分离源(母乳源和血液源)菌株的亲缘关系更近。不同分离源的菌株在携带毒力因子和耐药基因的数量上也存在显著差异($P<0.05$), 血液源菌株携带的毒力基因和耐药基因种类最多, 而母乳源菌株携带毒力基因和耐药基因种类最少。【结论】表皮葡萄球菌为了适应不同生境发生了适应性进化。相较于皮肤源和血液源菌株, 母乳源菌株在生物膜合成相关基因、耐药基因及毒力因子的携带率上较低。本研究为表皮葡萄球菌的适应性进化提供了新的见解, 并为后续母乳源分离株遗传背景的相关研究提供了一定的理论依据。

关键词: 表皮葡萄球菌; 比较基因组学; 遗传背景; 功能基因

资助项目: 国家自然科学基金(U22A20540)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U22A20540).

*Corresponding author. E-mail: hepingdd@vip.sina.com

Received: 2024-11-26; Accepted: 2025-01-03; Published online: 2025-02-21

Comparative genomics of *Staphylococcus epidermidis* isolates from breast milk

ZHAO Qian^{1,2,3,4}, LI Weicheng^{1,2,3,4}, LI Yu^{1,2,3,4}, SUN Jiaqi^{1,2,3,4}, ZHONG Zhi^{1,2,3,4}, ZHANG Heping^{1,2,3,4*}

1 Collaborative Innovative Center of Lactic Acid Bacteria and Fermented Dairy Products of Ministry of Education, Hohhot, Inner Mongolia, China

2 Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia, China

3 Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hohhot, Inner Mongolia, China

4 Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Hohhot, Inner Mongolia, China

Abstract: [Objective] *Staphylococcus epidermidis* is a coagulase-negative, Gram-positive coccobacillus that is widely found in the skin, breast milk, and blood. Bacteria in breast milk play a crucial role in the establishment of the gut microbiota in the intestinal tract and in the enhancement of immunity of infants. We then performed comparative genomic analyses to understand the genetic diversity and functional genes of breast milk-derived *S. epidermidis*. [Methods] We used the Illumina NovaSeq platform to sequence the genomes of 110 strains of *S. epidermidis* preliminarily isolated from healthy breast milk by our research team. We then performed comparative genomic analyses for the 110 strains and 263 skin, blood, and breast milk-derived *S. epidermidis* strains publicly available from the NCBI. [Results] The genome size of the 373 strains of *S. epidermidis* was (2.50 ± 0.33) Mb, with the G+C content was $(32.0 \pm 0.1)\%$, and the number of coding sequences (CDs) being $2\,331 \pm 368$. Differences existed in genome size and number of CDs among breast, blood, and skin isolates ($P < 0.05$), with blood isolates having the largest genome size and the highest number of CDs. The phylogenetic tree showed that the *S. epidermidis* isolates of the same source had obvious aggregation, and the breast milk isolates and blood isolates were more closely related. There were differences in the number of virulence factors and drug resistance genes among the strains of three sources ($P < 0.05$). The blood-derived strains exhibited the highest diversity of virulence and resistance genes, whereas the breast milk-derived strains displayed the lowest diversity of such genes. [Conclusion] *S. epidermidis* has undergone adaptive evolution to different habitats. Compared with skin- and blood-derived strains, breast milk-derived strains carry few genes related to biofilm synthesis, drug resistance, and virulence. This study gives new insights into the adaptive evolution of *S. epidermidis* and provides a theoretical basis for subsequent research on the genetic background of breast milk isolates.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*; comparative genomics; genetic background; functional genes

表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)广泛存在于皮肤、环境及母乳中^[1-2]。长期以来,表皮葡萄球菌被认为是一种人类共生微生物^[3],能够通过刺激黏膜相关 T 细胞来启动皮肤免疫应答^[4]。同时,表皮葡萄球菌在人体皮肤上会产生一种强大的鞘磷脂酶,增加神经酰胺的含量,从而防止皮肤脱水。鞘磷脂酶基因在表皮葡萄球菌健康皮肤分离株中高度保守,表明表皮葡萄球菌在维持皮肤生理功能完整性和预防过敏或感染方面发挥重要作用^[5]。然而,表皮葡萄球菌已逐渐成为一种常见的医院病原体,尤其是在免疫功能低下的患者中^[6]。部分表皮葡萄球菌能够产生生物膜,容易在植入的医疗器械上定植,尤其是血管内器械和脑脊液分流管,进而进入血液引发菌血症^[7]。

母乳最初被认为是无菌的液体。然而,随着对母乳研究的不断深入,现在普遍认为母乳中存在着丰富的微生物资源。2007 年, Martín 等^[8]证明母乳中存在多种细菌。Togo 等^[9]对目前已知人类乳汁中的微生物进行了系统评价,发现母乳中已鉴定出超过 820 种细菌和古菌,主要包括变形菌门和厚壁菌门。母乳菌群是婴儿早期肠道菌群的稳定来源,其中最常见的细菌属是葡萄球菌属和链球菌属,表皮葡萄球菌被多次分离及鉴定^[2]。Järvinen 等^[10]发现,母乳中的细菌对婴幼儿肠道中初始菌群的建立以及免疫力的提高起到至关重要的作用,主要通过竞争性排斥病原体和参与免疫系统的成熟来实现。葡萄球菌属,特别是表皮葡萄球菌,可能在这一过程中发挥了重要作用。因此,对母乳源表皮葡萄球菌展开深入研究显得尤为重要。

目前关于母乳源表皮葡萄球菌的研究主要集中在检出和鉴定层面,缺乏对其遗传特性的深入研究。因此,本研究采用 Illumina NovaSeq 高通量测序平台,对前期从母乳中分离得到的

110 株表皮葡萄球菌进行基因组测序,并结合 NCBI RefSeq 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)下载的 120 株皮肤分离源表皮葡萄球菌、101 株血液分离源表皮葡萄球菌及 42 株母乳源表皮葡萄球菌菌株基因组进行比较基因组学分析,以期解析母乳源表皮葡萄球菌的功能特征及进化历程。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

本研究依托内蒙古农业大学乳酸菌种质资源库,对前期分离自母乳中的 110 株表皮葡萄球菌进行基因组测序(经内蒙古农业大学科学研究和学术伦理专业委员会批准,批准号为 2018-059),并结合 NCBI RefSeq 数据库中血液源分离株(101 株)、皮肤源分离株(120 株)及母乳源分离株(42 株)的全基因组序列进行分析。110 株母乳源表皮葡萄球菌基因组序列已上传至国家微生物科学数据中心(<https://nmdc.cn/resource/genomics/genome/detail/NMDC60198554>),菌株相关信息见表 1。

1.2 主要试剂和仪器

LB 培养基, OXOID 公司;琼脂,厦门市赫凯生物科技有限公司;Tiangen 试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司。

电热恒温水浴锅,生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;超微量紫外分光光度计, NanoDrop 公司;电子天平,奥豪斯仪器(上海)有限公司;全自动高压干热灭菌器, SANYO 公司;高压蒸汽灭菌锅, TOMY 公司;漩涡振荡器, Scientific Industries 公司;超净工作台,上海智城分析仪器制造有限公司;光学显微镜,奥林巴斯(中国)公司;超纯水系统,昆山总馨机械有限公司。

表1 373株表皮葡萄球菌菌株相关信息

Table 1 Related information on 373 strains of *Staphylococcus epidermidis*

菌株号 Strain number	GCF/NMDC 号 GCF/NMDC number	分离源 Source	菌株号 Strain number	GCF/NMDC 号 GCF/NMDC number	分离源 Source
HTM3	NMDC20304984	Milk	BJM64-3	NMDC20305025	Milk
HTM4	NMDC20304985	Milk	BJM64-4	NMDC20305026	Milk
BJM60-10	NMDC20304986	Milk	BJM64-8	NMDC20305027	Milk
BJM60-11	NMDC20304987	Milk	BJM64-9	NMDC20305028	Milk
BJM60-12	NMDC20304988	Milk	BJM65-10	NMDC20305029	Milk
BJM60-1	NMDC20304989	Milk	BJM65-11	NMDC20305030	Milk
BJM60-2	NMDC20304990	Milk	BJM65-12	NMDC20305031	Milk
BJM60-3	NMDC20304991	Milk	BJM65-1	NMDC20305032	Milk
BJM60-4	NMDC20304992	Milk	BJM65-2	NMDC20305033	Milk
BJM60-5	NMDC20304993	Milk	BJM65-3	NMDC20305034	Milk
BJM60-6	NMDC20304994	Milk	BJM65-4	NMDC20305035	Milk
BJM60-7	NMDC20304995	Milk	BJM65-5	NMDC20305036	Milk
BJM60-8	NMDC20304996	Milk	BJM65-7	NMDC20305037	Milk
BJM60-9	NMDC20304997	Milk	BJM65-9	NMDC20305038	Milk
BJM61-11	NMDC20304998	Milk	BJM66-4	NMDC20305039	Milk
BJM61-1	NMDC20305000	Milk	BJM67-1	NMDC20305040	Milk
BJM61-2	NMDC20304999	Milk	BJM67-2	NMDC20305041	Milk
BJM61-3	NMDC20305001	Milk	BJM67-4	NMDC20305042	Milk
BJM61-4	NMDC20304984	Milk	BJM67-5	NMDC20305043	Milk
BJM61-5	NMDC20304985	Milk	BJM67-6	NMDC20305044	Milk
BJM61-6	NMDC20304986	Milk	Cai-13	NMDC20305045	Milk
BJM61-7	NMDC20304987	Milk	CLJ-2	NMDC20305046	Milk
BJM61-8	NMDC203049B8	Milk	CLJ-3	NMDC20305047	Milk
BJM61-9	NMDC20304989	Milk	EFR17-12	NMDC20305048	Milk
BJM62-10	NMDC20304990	Milk	EFR17-15	NMDC20305049	Milk
BJM62-11	NMDC20304991	Milk	EFR17-18	NMDC20305050	Milk
BJM62-12	NMDC20304992	Milk	EFR17-21	NMDC20305051	Milk
BJM62-1	NMDC20304993	Milk	EFR17-3	NMDC20305052	Milk
BJM62-2	NMDC20304994	Milk	EFR9-11	NMDC20305053	Milk
BJM62-3	NMDC20304995	Milk	EFR9-12	NMDC20305054	Milk
BJM62-4	NMDC20304996	Milk	EFR9-13	NMDC20305055	Milk
BJM62-6	NMDC20304997	Milk	EFR9-4	NMDC20305056	Milk
BJM62-7	NMDC20304998	Milk	EFR9-7	NMDC20305057	Milk
BJM62-8	NMDC20305000	Milk	EFR9-8	NMDC20305058	Milk
BJM62-9	NMDC20304999	Milk	EFR9-9	NMDC20305059	Milk
BJM63-13	NMDC20305001	Milk	EYR1-14	NMDC20305060	Milk
BJM63-14	NMDC20304984	Milk	EYR1-16	NMDC20305061	Milk
BJM63-1	NMDC20304985	Milk	EYR1-2	NMDC20305062	Milk

(待续)

(续表1)

菌株号 Strain number	GCF/NMDC 号 GCF/NMDC number	分离源 Source	菌株号 Strain number	GCF/NMDC 号 GCF/NMDC number	分离源 Source
BJM63-2	NMDC20304986	Milk	EYR2-10-1	NMDC20305063	Milk
BJM63-3	NMDC20304987	Milk	EYR2-10-2	NMDC20305064	Milk
BJM64-12	NMDC20305002	Milk	EYR2-12	NMDC20305065	Milk
EYR2-13-1	NMDC20305066	Milk	APC3789	GCF_009897435.1	Milk
EYR2-4-2	NMDC20305067	Milk	APC3882	GCF_009897505.1	Milk
EYR4-2	NMDC20305068	Milk	APC3780	GCF_009897515.1	Milk
EYR5-15	NMDC20305069	Milk	APC3779	GCF_009897605.1	Milk
EYR5-19-2	NMDC20305070	Milk	APC3778	GCF_009897625.1	Milk
EYR7-1	NMDC20305071	Milk	APC3776	GCF_009897655.1	Milk
EYR7-6	NMDC20305072	Milk	APC3777	GCF_009897685.1	Milk
GRM-6-2	NMDC20305073	Milk	APC3775	GCF_009897805.1	Milk
HLR12-3-1	NMDC20305074	Milk	APC3810	GCF_009897825.1	Milk
HLR2-2	NMDC20305075	Milk	APC3764	GCF_009897905.1	Milk
HLR4-1	NMDC20305076	Milk	APC3761	GCF_009897925.1	Milk
NXF-3	NMDC20305077	Milk	APC3762	GCF_009897935.1	Milk
WLN-1	NMDC20305078	Milk	APC3772	GCF_009897945.1	Milk
WLN-2	NMDC20305079	Milk	APC3763	GCF_009897975.1	Milk
WLN-4	NMDC203050B0	Milk	APC3768	GCF_009898025.1	Milk
WLN-5	NMDC203050B1	Milk	APC3769	GCF_009898035.1	Milk
WM-2	NMDC20305082	Milk	APC3771	GCF_009898055.1	Milk
WY-6	NMDC20305083	Milk	APC3785	GCF_009898115.1	Milk
YJQ-1	NMDC20305084	Milk	APC3808	GCF_009896645.1	Milk
YLL-3	NMDC20305085	Milk	APC3784	GCF_009896875.1	Milk
YLR-2	NMDC20305086	Milk	APC3783	GCF_009896905.1	Milk
YLR-4	NMDC20305087	Milk	APC3807	GCF_009896915.1	Milk
YLR-5	NMDC20305088	Milk	APC3782	GCF_009896965.1	Milk
YLR-6	NMDC20305089	Milk	APC3806	GCF_009896975.1	Milk
YLR-7	NMDC20305090	Milk	APC3804	GCF_009897025.1	Milk
YLR-8	NMDC20305091	Milk	APC3803	GCF_009897035.1	Milk
ZJH-1	NMDC20305092	Milk	APC3802	GCF_009897065.1	Milk
ZJH-3	NMDC20305093	Milk	APC3800	GCF_009897075.1	Milk
APC3801	GCF_009897085.1	Milk	A11	GCF_004329455.1	Skin
APC3799	GCF_009897125.1	Milk	ADQBG	GCF_036419715.1	Skin
APC3883	GCF_009897145.1	Milk	ADQBK	GCF_036419775.1	Skin
APC3797	GCF_009897165.1	Milk	AH6072	GCF_025665415.1	Skin
APC3798	GCF_009897195.1	Milk	CDC120	GCF_003856395.1	Skin
APC3795	GCF_009897225.1	Milk	CDC121	GCF_003856455.1	Skin
APC3781	GCF_009897235.1	Milk	HD33	GCF_006337225.1	Skin
APC3794	GCF_009897265.1	Milk	HD43	GCF_006337205.1	Skin

(待续)

(续表1)

菌株号 Strain number	GCF/NMDC 号 GCF/NMDC number	分离源 Source	菌株号 Strain number	GCF/NMDC 号 GCF/NMDC number	分离源 Source
APC3793	GCF_009897305.1	Milk	HD66	GCF_006337185.1	Skin
APC3792	GCF_009897315.1	Milk	JH	GCF_012029995.1	Skin
APC3791	GCF_009897335.1	Milk	JH-S-1	GCF_016107425.1	Skin
APC3790	GCF_009897365.1	Milk	JH-S-3	GCF_016107415.1	Skin
APC3788	GCF_009897375.1	Milk	JONWP017	GCF_037699445.1	Skin
APC3787	GCF_009897425.1	Milk	JONWP018	GCF_037699365.1	Skin
JONWP026	GCF_037699085.1	Skin	JONWP070	GCF_037697275.1	Skin
JONWP027	GCF_037699045.1	Skin	JONWP071	GCF_037697195.1	Skin
JONWP028	GCF_037698945.1	Skin	JONWP072	GCF_037697235.1	Skin
JONWP029	GCF_037698925.1	Skin	JONWP073	GCF_037697155.1	Skin
JONWP030	GCF_037698845.1	Skin	JONWP074	GCF_037697115.1	Skin
JONWP031	GCF_037698905.1	Skin	JONWP075	GCF_037697035.1	Skin
JONWP032	GCF_037698885.1	Skin	JONWP076	GCF_037697055.1	Skin
JONWP033	GCF_037698725.1	Skin	JONWP077	GCF_037696995.1	Skin
JONWP035	GCF_037698685.1	Skin	JONWP079	GCF_037696835.1	Skin
JONWP036	GCF_037698705.1	Skin	JONWP080	GCF_037696875.1	Skin
JONWP037	GCF_037698745.1	Skin	JONWP081	GCF_037696855.1	Skin
JONWP038	GCF_037698585.1	Skin	JONWP082	GCF_037696795.1	Skin
JONWP039	GCF_037698525.1	Skin	JONWP083	GCF_037696755.1	Skin
JONWP040	GCF_037698485.1	Skin	JONWP084	GCF_037696655.1	Skin
JONWP041	GCF_037698495.1	Skin	JONWP085	GCF_037696675.1	Skin
JONWP042	GCF_037698465.1	Skin	JONWP086	GCF_037696635.1	Skin
JONWP043	GCF_037698405.1	Skin	JONWP087	GCF_037696595.1	Skin
JONWP044	GCF_037698325.1	Skin	JONWP088	GCF_037696575.1	Skin
JONWP045	GCF_037698295.1	Skin	JONWP089	GCF_037696455.1	Skin
JONWP046	GCF_037698245.1	Skin	JONWP090	GCF_037696475.1	Skin
JONWP047	GCF_037698285.1	Skin	JONWP091	GCF_037696435.1	Skin
JONWP048	GCF_037698225.1	Skin	JONWP092	GCF_037696395.1	Skin
JONWP049	GCF_037698145.1	Skin	JONWP093	GCF_037696335.1	Skin
JONWP050	GCF_037698115.1	Skin	JONWP094	GCF_037696235.1	Skin
JONWP051	GCF_037698045.1	Skin	JONWP096	GCF_037696275.1	Skin
JONWP052	GCF_037698065.1	Skin	JONWP099	GCF_037696055.1	Skin
JONWP053	GCF_037698105.1	Skin	JONWP100	GCF_037696075.1	Skin
JONWP054	GCF_037697945.1	Skin	JONWP101	GCF_037696015.1	Skin
JONWP055	GCF_037697845.1	Skin	JONWP102	GCF_037696035.1	Skin
JONWP056	GCF_037697895.1	Skin	JONWP103	GCF_037695885.1	Skin
JONWP057	GCF_037697865.1	Skin	JONWP104	GCF_037695865.1	Skin
JONWP059	GCF_037697725.1	Skin	JONWP105	GCF_037695845.1	Skin
JONWP060	GCF_037697685.1	Skin	JONWP106	GCF_037695775.1	Skin

(待续)

(续表1)

菌株号 Strain number	GCF/NMDC 号 GCF/NMDC number	分离源 Source	菌株号 Strain number	GCF/NMDC 号 GCF/NMDC number	分离源 Source
JONWP061	GCF_037697695.1	Skin	JONWP107	GCF_037695695.1	Skin
JONWP062	GCF_037697625.1	Skin	JONWP108	GCF_037695655.1	Skin
JONWP063	GCF_037697525.1	Skin	JONWP109	GCF_037695615.1	Skin
JONWP064	GCF_037697565.1	Skin	JONWP124	GCF_037700335.1	Skin
JONWP065	GCF_037697475.1	Skin	JONWP152	GCF_037694235.1	Skin
JONWP066	GCF_037697495.1	Skin	JONWP164	GCF_037693745.1	Skin
JONWP067	GCF_037697415.1	Skin	VSE1	GCF_003979615.1	Skin
JONWP068	GCF_037697315.1	Skin	VSE2	GCF_003979655.1	Skin
JONWP097	GCF_037696195.1	Skin	SE54	GCF_008922375.1	Blood
BB403117S	GCF_008922545.1	Blood	SE56	GCF_008922385.1	Blood
BB403149G	GCF_008922525.1	Blood	SE58	GCF_008922365.1	Blood
BB403169X	GCF_008923145.1	Blood	SE59	GCF_008922345.1	Blood
BB405012Y	GCF_008922485.1	Blood	SE60	GCF_008922265.1	Blood
BB405684Z	GCF_008922505.1	Blood	SE63	GCF_008922315.1	Blood
BB409909V	GCF_008923085.1	Blood	SE64	GCF_008922285.1	Blood
BB411089T	GCF_008923045.1	Blood	SE66	GCF_008922245.1	Blood
BB411582T	GCF_008923005.1	Blood	SE67	GCF_009026095.1	Blood
BB412943	GCF_008922995.1	Blood	SE68	GCF_009026065.1	Blood
BB413468Z	GCF_008922985.1	Blood	SE69	GCF_009026045.1	Blood
BB413483J	GCF_008922955.1	Blood	SE70	GCF_008922205.1	Blood
BB417762	GCF_008922945.1	Blood	SE73	GCF_008922175.1	Blood
BB418619Q	GCF_008922925.1	Blood	SE74	GCF_008922155.1	Blood
BB420483A	GCF_008922885.1	Blood	SE75	GCF_008922165.1	Blood
BB421362A	GCF_008922895.1	Blood	SE78	GCF_008922115.1	Blood
BB424986M	GCF_008922855.1	Blood	SE79	GCF_008922095.1	Blood
BB424987J	GCF_008922845.1	Blood	SE83	GCF_008922045.1	Blood
BB431156H	GCF_008922805.1	Blood	VCU014	GCF_000626815.1	Blood
BB431437E	GCF_008922785.1	Blood	LRKNS092	GCF_001658805.1	Blood
BB434495N	GCF_008922795.1	Blood	LRKNS093	GCF_001658815.1	Blood
BB436056Y	GCF_008922745.1	Blood	LRKNS111	GCF_001662985.1	Blood
BB436246W	GCF_008922755.1	Blood	LRKNS112	GCF_001663025.1	Blood
BB437325D	GCF_008922725.1	Blood	LRKNS113	GCF_001663015.1	Blood
BB437754V	GCF_008922695.1	Blood	LRKNS114	GCF_001662145.1	Blood
BB438257K	GCF_008922655.1	Blood	LRKNS115	GCF_001662175.1	Blood
BB440693L	GCF_008922645.1	Blood	LRKNS116	GCF_001662165.1	Blood
BB441771A	GCF_008922605.1	Blood	LRKNS117	GCF_001662155.1	Blood
BB442838N	GCF_008922565.1	Blood	LRKNS118	GCF_001662225.1	Blood
BB443408J	GCF_008922555.1	Blood	Lt3p20	GCF_001658905.1	Blood
M0026	GCF_000551165.1	Blood	M15_2005	GCF_026157025.1	Blood

(待续)

(续表1)

菌株号 Strain number	GCF/NMDC 号 GCF/NMDC number	分离源 Source	菌株号 Strain number	GCF/NMDC 号 GCF/NMDC number	分离源 Source
M0881	GCF_000362145.1	Blood	NGS-ED-1107	GCF_000966705.1	Blood
NIH04003	GCF_000276005.1	Blood	NGS-ED-1109	GCF_000966715.1	Blood
NIH04008	GCF_000276085.1	Blood	NGS-ED-1110	GCF_000966815.1	Blood
NIH05001	GCF_000276105.1	Blood	NGS-ED-1111	GCF_000966755.1	Blood
NIH05003	GCF_000276025.1	Blood	NGS-ED-1117	GCF_000966765.1	Blood
NIH05005	GCF_000276125.1	Blood	NGS-ED-1118	GCF_000966775.1	Blood
NIH06004	GCF_000276045.1	Blood	SH03_17	GCF_002799485.1	Blood
NIH08001	GCF_000276065.1	Blood	SH05_16	GCF_002799505.1	Blood
SE48	GCF_008922455.1	Blood	SH06_17	GCF_002799565.1	Blood
SE49	GCF_008922445.1	Blood	TMDU-128	GCF_024204725.1	Blood
SE53	GCF_008922415.1	Blood	VSE37	GCF_003956755.1	Skin
TMDU-137	GCF_024204745.1	Blood	VSE39	GCF_003956885.1	Skin
TMDU-190	GCF_024204765.1	Blood	VSE4	GCF_003979705.1	Skin
VSE36	GCF_003980285.1	Skin	VSE41	GCF_003956805.1	Skin
TMDU-265	GCF_024204785.1	Blood	VSE42	GCF_003956875.1	Skin
TMDU-300	GCF_024204805.1	Blood	VSE43	GCF_003956905.1	Skin
TMDU-302	GCF_024204825.1	Blood	VSE44	GCF_003980205.1	Skin
TMDU-323	GCF_024204845.1	Blood	VSE46	GCF_003956995.1	Skin
TMDU-41	GCF_024204705.1	Blood	VSE47	GCF_003956955.1	Skin
TSM-18	GCF_024204905.1	Blood	VSE49	GCF_003956785.1	Skin
TSM-31	GCF_024204885.1	Blood	VSE5	GCF_003979695.1	Skin
TSM-36	GCF_024204925.1	Blood	VSE50	GCF_003980275.1	Skin
TSM-47	GCF_024204945.1	Blood	VSE52	GCF_003956965.1	Skin
TSM-50	GCF_024204965.1	Blood	VSE53	GCF_003956975.1	Skin
TSM-51	GCF_024204985.1	Blood	VSE54	GCF_003956855.1	Skin
HESN016B	GCF_015070675.1	Blood	VSE56	GCF_003980255.1	Skin
HESN103B	GCF_015070395.1	Blood	VSE57	GCF_003956865.1	Skin
IRL01	GCF_009685135.1	Blood	VSE58	GCF_003957035.1	Skin
C03	GCF_015645175.1	Blood	TMDU-2014-62	GCF_024204865.1	Blood
VSE3	GCF_003979715.1	Skin	JONWP025	GCF_037699105.1	Skin
VSE35	GCF_003956765.1	Skin	JONWP069	GCF_037697355.1	Skin
Mt1p16	GCF_001683645.1	Blood			

1.3 菌株活化、基因组 DNA 的提取及基因组测序

挑取单个菌落于 LB 液体培养基中，置于 37 °C 有氧条件下 4 000 r/min 培养 24 h 后传代培养至二代，将二代菌液以 2% 的接种量接种于 35 mL 液体培养基中，置于 37 °C 有氧条件下扩

大培养。培养 24 h 后，菌液以 3 000×g 离心 5 min，弃上清，使用 PBS 缓冲溶液洗涤菌液 2 次，再加入 5 mL 缓冲液，抽取 1 mL 菌液以 3 000×g 离心 5 min 后，收集细菌菌体。使用十六烷基三甲基溴化铵法(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB 法)提取表皮葡萄球菌的基因组

DNA^[11-12]。使用超微量紫外分光光度计及 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测菌株的 DNA 浓度和纯度。

构建约 400 bp 的文库，并使用 Illumina NovaSeq 6000 高通量测序平台进行测序，选取 150 bp 构建 pair-end (PE) 测序文库，高质量数据平均覆盖度在 500× 左右。菌株基因组测序委托北京诺禾致源生物科技股份有限公司完成。

使用 Trimmomatic 软件^[13] (v0.39) 对测序得到的原始 reads 进行过滤，去除低质量数据和接头序列得到纯净数据。

1.4 基因组组装

使用 readfq.v5 软件对数据进行进一步过滤，保留 500× 左右的高质量数据。使用 SOAPdenovo2 软件^[14] (v2.04) 对菌株进行组装，挑选 N50 和 N90 较长且 scaffold 数较少的 Kmer。使用 SOAP 软件^[14] (v2.21) 基于过滤后的高质量 reads 对组装结果进行单碱基校正。使用 GapCloser 软件 (<http://sourceforge.net/projects/soapdenovo2/files/GapCloser>) 进行补空缺。使用 GTDB 数据库 (<https://gtdb.ecogenomic.org/>)^[15] 对分离株的分类学地位进行确认。使用 CheckM 软件^[16] (v1.1.9) 评估菌株基因组的完整度 (completeness) 和污染度 (contamination)。

1.5 比较基因组分析

1.5.1 平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI) 计算

参考 Jain 等^[17]报道的方法计算菌株间的两两 ANI 值。使用 TBtools^[18] 软件进行可视化处理。

1.5.2 菌群泛-核心基因集构建

利用 Prokka 软件^[19] 对菌株基因序列进行预测和注释，再通过 Roary 软件^[20] 分析菌株基因组，以氨基酸序列相似性大于 95% 为原则识别基因家族，将菌株共同拥有的基因家族定义为核心基因集，全部基因家族定义为泛基因集。最后利用 PanGP 软件^[21] 绘制泛-核心基因积累曲线。

1.5.3 系统发育树构建

利用 Prokka 软件^[19] 对菌株基因组进行基因预测后，通过 Roary 软件^[20] 分析得到的核心基因序列，使用 TreeBest 软件^[22] (<http://www.mybiosoftware.com/treebest>) 中的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树，Bootstrap 值设定为 1 000。

1.5.4 功能基因组预测和注释

将 Prokka 软件^[19] 注释后得到的 faa 文件与蛋白质直系同源簇数据库 (cluster of orthologous groups of proteins, COG) (vCOG5.0)^[23] 进行比对，完成功能基因的预测与注释。

1.5.5 耐药基因注释

通过耐药基因数据库 (comprehensive antibiotic resistance database, CARD) (<http://arpcard.memaster.ca>) 对 373 株表皮葡萄球菌进行耐药基因分析。将表皮葡萄球菌蛋白序列与耐药基因数据库^[24] 进行比对，结果中相似度 > 85% 且 E 值 < 1×10^{-5} 的蛋白序列确定为耐药基因。

1.5.6 毒力基因注释

通过毒力基因数据库 (virulence factors of pathogenic bacteria, VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)^[25] 对 373 株表皮葡萄球菌进行毒力基因分析。将表皮葡萄球菌蛋白序列与毒力基因数据库进行比对，将相似度 > 95%、匹配长度 > 300 且 E 值 < 1×10^{-5} 的蛋白序列确定为毒力基因。

1.5.7 统计学分析及数据可视化

使用 R 软件 (v4.2.2) 对数据进行统计学分析和数据可视化。利用 iTol 网站^[26] 对系统发育树结果进行可视化。数据可视化使用 ggplot2 包，使用 pheatmap 包绘制热图。

2 结果与分析

2.1 表皮葡萄球菌基因组基本信息

对 373 株表皮葡萄球菌基因组质量评估发现，所有菌株的完整性均 > 95%，污染度 < 5%，

scaffold<300, 属于高质量基因组草图, 满足后续分析要求^[27]。基因组组装结果显示, 373 株表皮葡萄球菌的平均基因组大小为 (2.50 ± 0.33) Mb, G+C 含量为 $(32.0\pm 0.1)\%$, 编码序列(coding sequence, CDs)数量为 $(2\,331\pm 368)$ 个。

对不同分离源菌株的基因组特征进行比较发现(图 1), 3 种分离源菌株在基因组大小和 CDs 数量方面存在显著差异($P<0.05$), 均呈现血液源菌株高于皮肤源菌株, 高于母乳源菌株的特征。母乳源、血液源和皮肤源菌株的基因组大小分别为 (2.50 ± 0.13) 、 (2.62 ± 0.21) 和 (2.52 ± 0.23) Mb; 对应的 CDs 数量分别为 $(2\,290\pm 130)$ 、 $(2\,466\pm 233)$ 和 $(2\,323\pm 280)$ 个。母乳源菌株的基因组大小和 CDs 数量均显著低于其他 2 种分离源菌株($P<0.05$), 这可能与母乳环境中营养物质较为丰富有关^[28]。相反血液源菌株为了适应血液这种特殊的生境, 遗传物质发生变异, 可能获得了一些外源基因^[29]。

2.2 ANI 分析

为解析表皮葡萄球菌的遗传多样性, 本研究对 373 株表皮葡萄球菌两两之间的 ANI 值进行了计算。结果如图 2 所示, 373 株菌株两两间的 ANI 值均大于 96.50%, 模式菌株 ATCC 14990^T

与其他菌株的 ANI 值范围为 $(97.40\pm 0.40)\%$ 。根据 Richter 等^[30]的标准, 物种的 ANI 界定范围为 94%–95%, 因此在基因组水平上, 所有菌株均属于同一物种。一个有趣的现象是, 表皮葡萄球菌 ANI 值的聚类与其分离源存在一定的相关性。整体而言, 体内分离源(母乳和血液)菌株和体外分离源(皮肤)菌株各聚成一类。

2.3 菌群泛-核心基因集分析

利用 Roary 软件构建了 373 株表皮葡萄球菌的核-泛基因集^[31]。结果如图 3A 所示, 373 株菌株的泛基因集共包含 9 231 个基因。其中, 核心基因(core gene, 所有菌株共有的基因) 1 267 个, 附属基因(accessory gene, 至少在 2 株菌中存在) 5 521 个, 特异基因(unique gene, 仅在 1 株菌中存在) 2 263 个。通过绘制核-泛基因集曲线发现, 核心基因数量随着菌株数量的增加趋于稳定, 而泛基因数量则相反, 随着菌株数量的增加呈现开放状态。

泛基因集中除去核心基因和特异基因, 剩余的基因被称为附属基因, 又称非必需基因, 可增强菌株的生长优势或加强环境适应性^[32]。母乳分离源菌株的核心基因数量为 1 832 个, 附属基因数量为 2 823 个。血液分离源菌株的核心

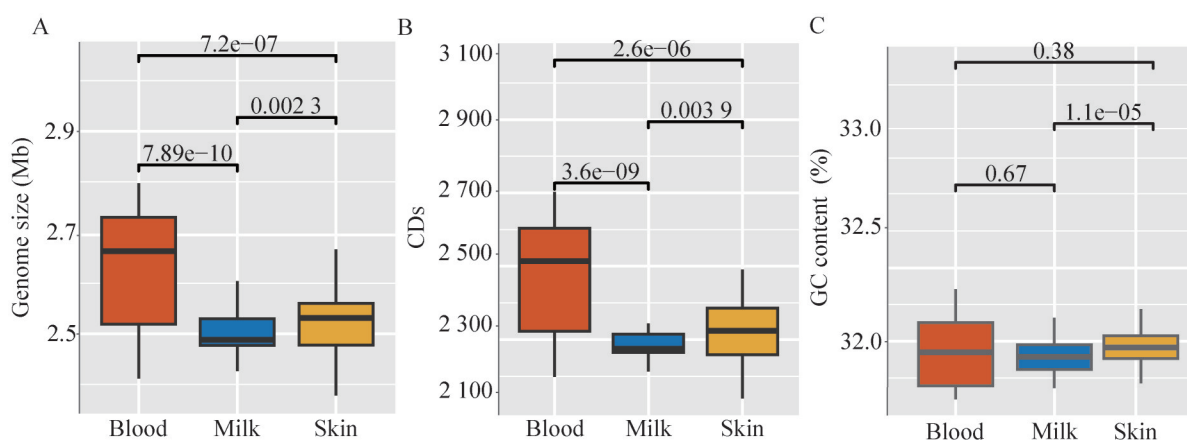


图1 不同分离源表皮葡萄球菌菌株基因组基本特征比较。A: 菌株基因组大小; B: 菌株CDs数; C: 菌株G+C含量。

Figure 1 Comparison of the basic genomic characteristics of *Staphylococcus epidermidis* strains from different isolated sources. A: Genome size of the strains; B: Number of CDs of the strains; C: G+C content of the strains.

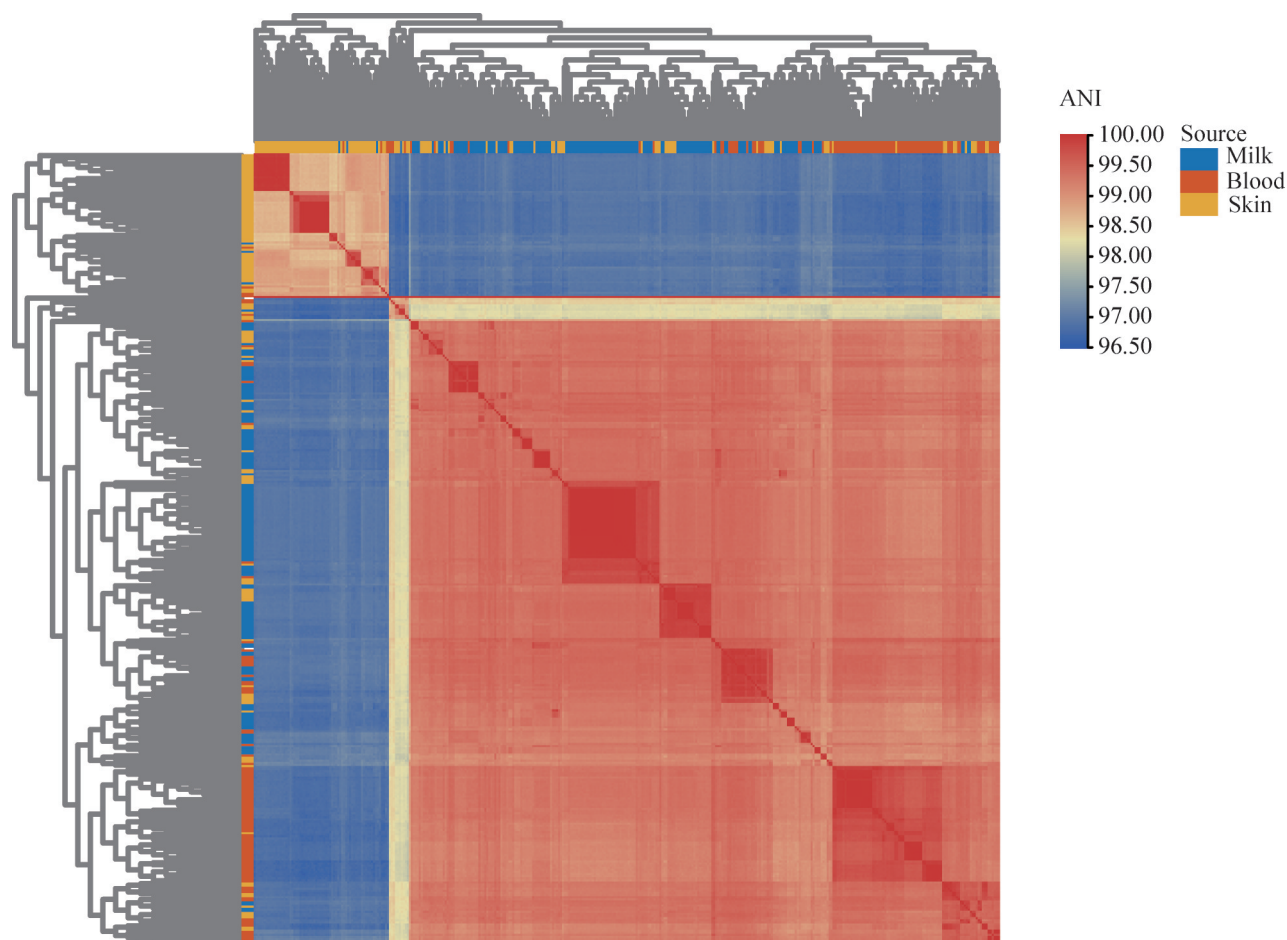


图2 不同分离源表皮葡萄球菌ANI值聚类热图

Figure 2 Cluster heat map of ANI values of *Staphylococcus epidermidis* from different isolated sources.

基因数量为 1 799 个, 附属基因数量为 3 335 个。皮肤分离源菌株的核心基因数量为 1 405 个, 附属基因数量为 5 945 个, 结果如图 3B 所示。皮肤源和血液源菌株的核心基因数量较少, 可能与这 2 种分离源相对开放有关, 菌株获得了更多外源基因去适应环境; 而母乳源菌株的核心基因数量最多, 这可能与母乳这种特殊生境有关, 母乳环境营养丰富且正常状态下无其他病原菌, 细菌基因组可通过丢失一些非必要基因来更好地适应营养丰富的环境^[28]。

2.4 系统发育树分析

为评估表皮葡萄球菌菌株之间的遗传距离, 本研究基于 1 267 个核心基因采用 NJ 法构建了

系统发育树。如图 4 所示, 表皮葡萄球菌群体可大致分为 2 个进化分支: Clade 1 主要为体表分离源(皮肤), Clade 2 主要为体内分离源(母乳及血液)。在 Clade 2 中, 菌株在分离源上也表现出明显的聚类趋势, 母乳源菌株聚为一类, 血液源菌株聚为一类。这一结果与 ANI 值分析基本一致, 表明菌株的聚类与其分离源存在一定的相关性。Byrd 等^[33]研究报道并证实, 人类皮肤上含有丰富的葡萄球菌属成员, 包括与人类皮肤共生的表皮葡萄球菌。此外, 一项基于母乳细菌培养的研究发现, 所有母乳样本中的细菌与从母亲乳头培养的细菌相同^[34], 说明母体皮肤微生物可通过乳头进入并定居乳腺, 最终出现在母乳中。上述结果表明表皮葡萄球菌很

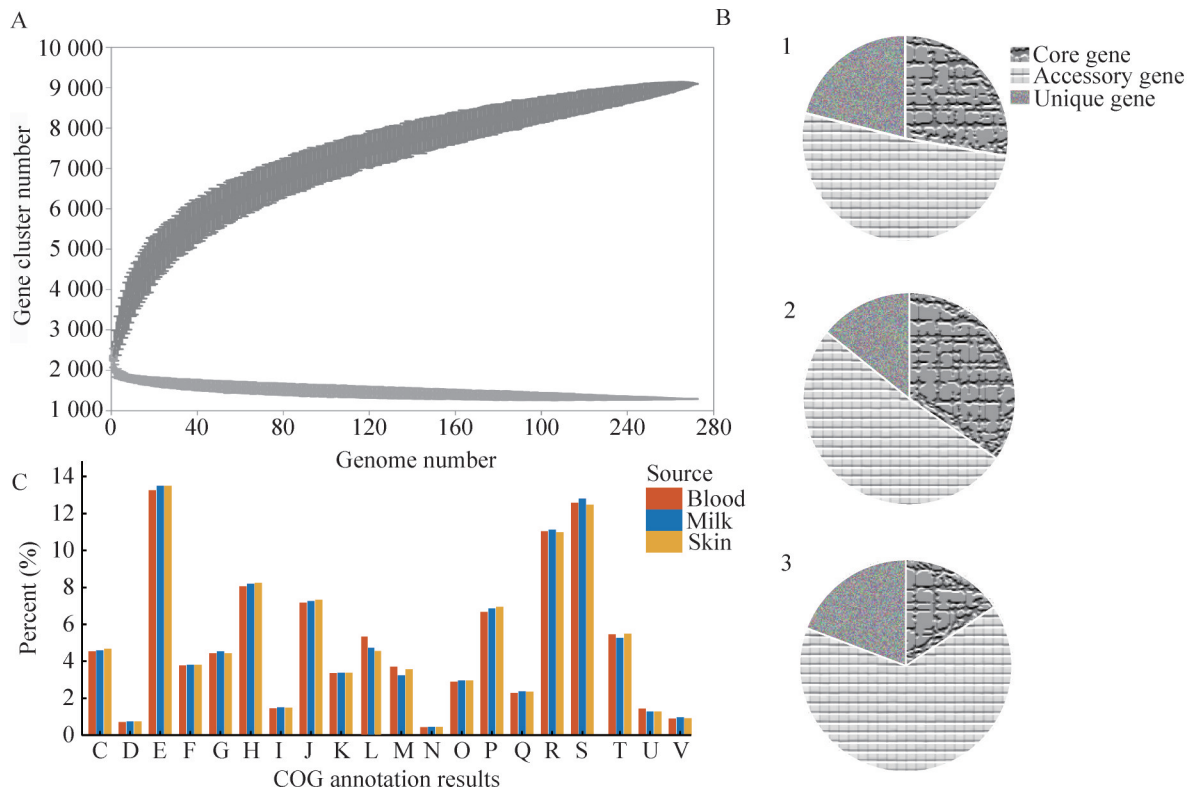


图3 373株表皮葡萄球菌核-泛基因组、相关基因占比及功能基因注释。A: 373株表皮葡萄球菌核-泛基因组; B: 3种分离源表皮葡萄球菌核心基因, 辅助基因及特有基因占比(1: 血液源; 2: 母乳源; 3: 皮肤源); C: 373株表皮葡萄球菌功能基因注释(C: 能量生成和转换; D: 细胞周期控制、细胞分裂和染色体分裂; E: 氨基酸转运及代谢; F: 核苷酸转运及代谢; G: 碳水化合物转运及代谢; H: 辅酶转运及代谢; I: 脂质转运及代谢; J: 翻译、核糖体结构和生物合成; K: 转录; L: 复制、重组和修复; M: 细胞壁、细胞膜、细胞被膜生物合成; N: 细胞运动; O: 翻译后修饰, 蛋白质转换和伴侣蛋白; P: 无机离子转运及代谢; Q: 次级代谢物生物合成、转运及催化; R: 主要功能预测; S: 未知功能; T: 信号转导机制; U: 细胞内运输、分泌及囊泡运输; V: 防御机制)。

Figure 3 Core-pan genome set of 373 strains of *Staphylococcus epidermidis*, proportion of related genes, and annotation of functional genes. A: Sclerotio-pangene set of 373 strains of *Staphylococcus epidermidis*; B: The proportion of core genes, helper genes and endemic genes of *Staphylococcus epidermidis* from three isolated sources (1: Blood source; 2: Milk source; 3: Skin source); C: Annotation of functional genes of 373 strains of *Staphylococcus epidermidis* (C: Energy production and conversion; D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; E: Amino acid transport and metabolism; F: Nucleotide transport and metabolism; G: Carbohydrate transport and metabolism; H: Coenzyme transport and metabolism; I: Lipid transport and metabolism; J: Translation, ribosomal structure and biogenesis; K: Transcription; L: Replication; recombination and repair; M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis; N: Cell motility; O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P: Inorganic ion transport and metabolism; Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; R: General function prediction only; S: Function unknown; T: Signal transduction mechanisms; U: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V: Defense mechanisms).

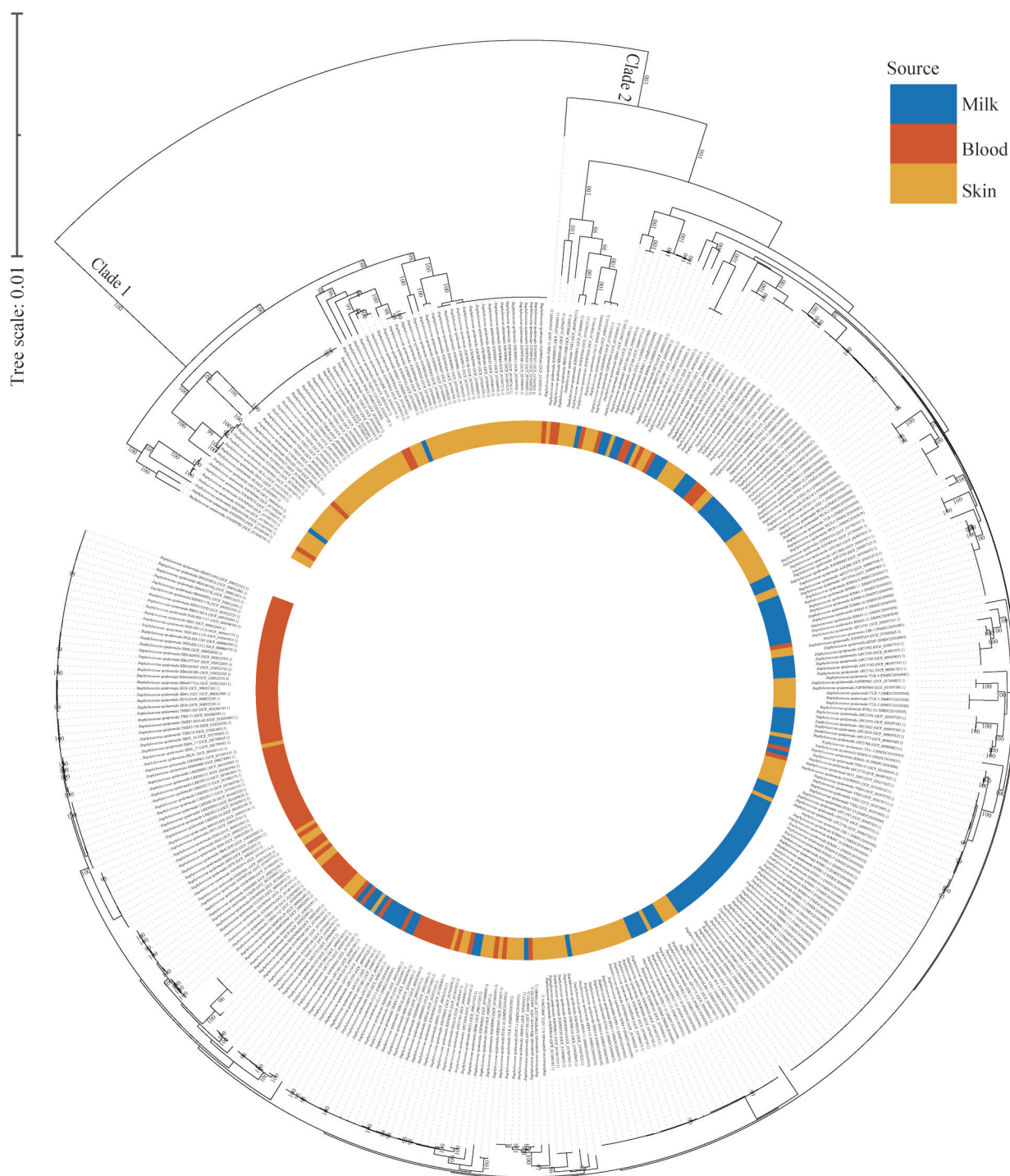


图4 基于373株表皮葡萄球菌的1 267个核心基因构建的系统发育树。0.01代表比例标尺，分支上的数值代表置信度。

Figure 4 Phylogenetic tree based on 1 267 core genes of 373 strains of *Staphylococcus epidermidis*. The value of 0.01 represents the sequence deviation value, the number on the branch point represents the confidence value.

可能也通过这种方式进入并定居于母乳中, 进而发生了一系列适应性进化。

2.5 功能基因注释

为了对表皮葡萄球菌的功能基因进行初步研究, 本研究基于 COG 数据库对 373 株表皮葡萄球菌进行功能基因注释。如图 3C 所示, 373 株菌株的主要功能为未知功能(S), 其次是氨基酸转运与代谢(E) (15%)、辅酶转运与代谢(H) (9%)、核糖体结构和生物合成(J) (7%)及无机离子转运与代谢(P) (6%)等。

对不同分离源菌株的主要功能进行比较发现, 3 种分离源的菌株在主要功能上并无显著差异($P>0.05$), 表明不同分离源的表皮葡萄球菌在主要功能上表现出较高的稳定性。

2.6 耐药基因

为了探究不同分离源菌株在耐药基因携带上的差异, 本研究通过耐药基因数据库对 373 株表皮葡萄球菌基因组进行注释。注释结果显示, 373 株表皮葡萄球菌共鉴定出 13 种潜在的耐药基因, 且 3 种分离源菌株在耐药基因数量上存在显著差异($P<0.05$, 图 5A)。母乳源分离株的耐药基因种类为 10 种, 数量为 1-7 个; 血液源分离株的耐药基因种类为 11 种, 数量为 1-9 个; 皮肤源分离株的耐药基因种类为 12 种, 数量为 1-8 个。母乳源菌株的耐药基因携带数量显著低于皮肤源和血液源菌株($P<0.05$), 且耐药基因种类也是 3 种分离源中最少的。在 3 种分离源中, 血液源菌株的耐药基因携带率高于皮肤源和母乳源菌株。这可能与血液源菌株均分离自败血症患者的血液有关, 抗生素在败血症治疗过程中发挥着重要的作用^[35], 长期使用抗生素可通过选择性压力促使细菌发生基因突变或获得耐药基因, 进而导致菌株耐药性的形成。此外, 基因层面的耐药基因检出仅表明该菌株具有耐药的可能性, 这与叶亚菲等的研究结论一致^[36]。细菌为在自然环境中生存, 其某些结构基因编码产物具有外排泵功能, 可将菌体内的特定物质(代谢产物、有害物质、抗菌药物等)排出菌

体, 表皮葡萄球菌中的 *norA* 和 *qacA/B* 基因可能属于此类基因, 但其相关机制仍有待研究^[36]。

为了进一步了解菌株耐药基因的分布是否与分离源有关, 绘制了耐药基因存在与缺失的热图, 结果如图 5B 所示。结果显示, 仅有少数耐药基因(*mecA*、*qacA/B*)的分布与分离源存在明显相关性。其中, *mecA* 在皮肤源菌株中的携带率显著低于母乳源和血液源菌株($P<0.05$), 而 *qacA/B* 在母乳源分离株中的携带率显著低于皮肤源和血液源菌株($P<0.05$)。 *mecA* 基因可编码产生青霉素结合蛋白, 使细菌对 β -内酰胺类抗生素的亲和力下降, 从而引发对甲氧西林的耐药^[37]。在 3 种分离源中, *mecA* 基因在血液源菌株中的携带率最高(检出率为 94%), 而在皮肤源菌株中的携带率最低(检出率为 27%)。甲氧西林属于青霉素类抗生素, 主要用于治疗败血症, 而血液源表皮葡萄球菌的提供者均为败血症患者, 这也能解释 *mecA* 基因在血液源菌株中高携带率的原因, 可能是在长期暴露于抗生素的选择性压力下, 血液源菌株通过基因突变或水平基因转移等途径获得了耐药基因^[38]。 *qacA/B* 是一种抗生素外排泵基因, *qacA/B* 可使菌株对消毒剂类物质具有一定耐药性^[39], 该基因在血液源菌株中的携带率最高(携带率为 67%), 皮肤源菌株次之(携带率为 39%), 母乳源菌株最低(携带率为 23%)。

细菌主要通过产生钝化酶、药靶变异、药物外排和膜渗透性改变等 4 种机制形成耐药性, 其中由外排泵介导的耐药性最为普遍^[36]。373 株表皮葡萄球菌耐药基因携带情况如图 5B 所示, *norA* 基因的携带率为 97%, *mecA* 基因携带率为 58%, *mecR1* 基因携带率为 38%, *qacA/B* 基因携带率均为 36%, *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* 基因携带率为 35%, 其余耐药基因 [*cfpA*、*fexA*、*msrA*、*vga(A)*、*vga(B)*、*vga(A)LC*、*tet(K)*] 的携带率均低于 35%。其中 *norA* 基因在 3 种分离源中携带率均高于 95%, 因此该基因可能是一种固有耐药基因, 这与叶亚菲等^[36]的结论一致。 *norA* 基

因是一种抗生素外排泵基因,且外排泵基因在环丙沙星和左氧氟沙星耐药性中起着关键作用^[36],表明 373 株表皮葡萄球菌可能对环丙沙星和左氧氟沙星具有一定的耐药性。

2.7 毒力基因

Severn 等^[6]报道,表皮葡萄球菌已逐渐成为一种常见的医院病原体,特别是对免疫功能低下的患者会造成相关感染。一般认为毒力因子是致病菌入侵、黏附、攻击宿主免疫系统的功能基因。因此,本研究通过与毒力基因数据库(virulence factors of pathogenic bacteria, VFDB)进行比对,在 373 株表皮葡萄球菌中共鉴定出 18 种毒力基因。表皮葡萄球菌携带的毒力基因

主要编码黏附素、荚膜多糖、胞外酶、表面蛋白等功能蛋白,这些毒力基因在表皮葡萄球菌感染宿主时,通过编码毒力因子使表皮葡萄球菌对宿主细胞产生黏附、定殖、抗吞噬和入侵等作用。平均每株表皮葡萄球菌携带 16 种毒力基因,其中血液源和皮肤源菌株携带毒力基因种类为 16 种,母乳源菌株携带毒力基因种类为 15 种,且 3 种分离源菌株在毒力基因数量上存在显著差异($P<0.05$,图 6A)。

为了解毒力基因的分布是否与菌株分离源有关,本研究利用表皮葡萄球菌的毒力基因存在与缺失情况绘制了热图(图 6B),发现毒力基因的分布与分离源存在一定相关性。统计结果

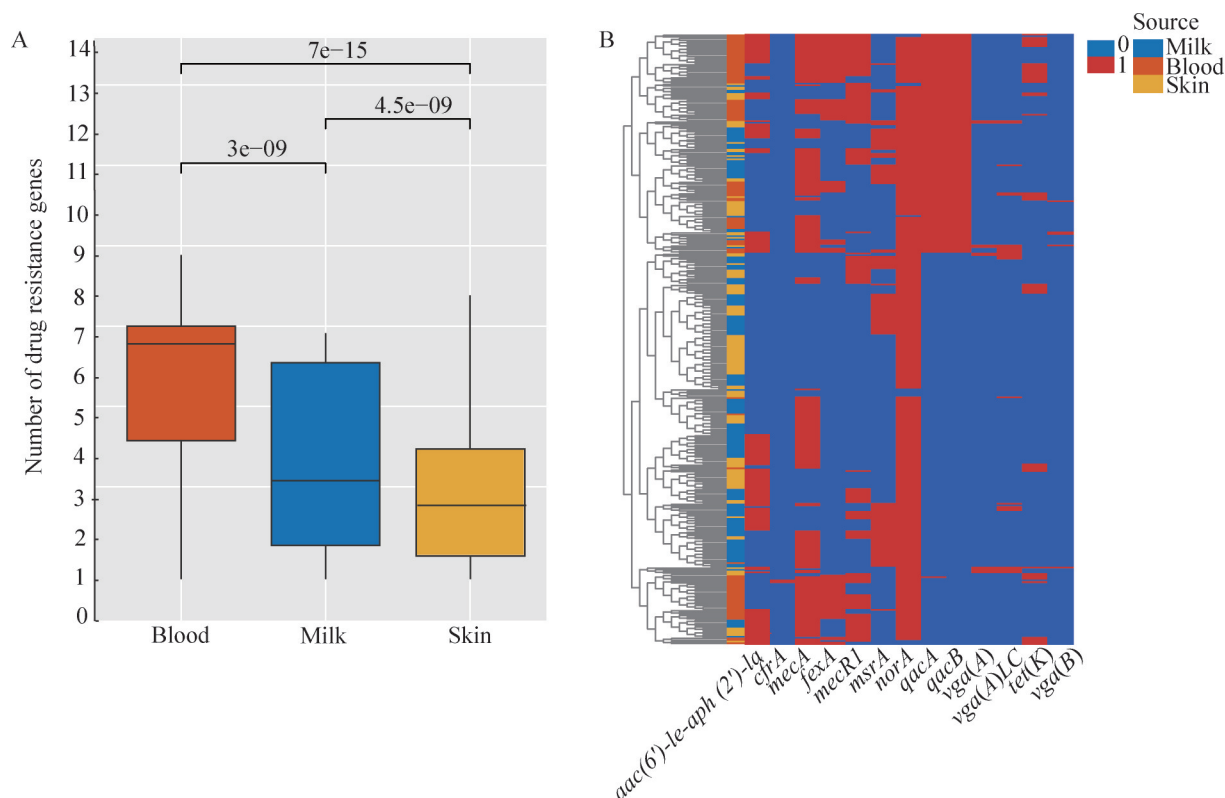


图5 373株表皮葡萄球菌耐药基因相关信息。A: 不同分离源菌株在耐药基因数量上差异分析; B: 373株表皮葡萄球菌耐药基因存在与缺失热图(0代表缺失; 1代表存在)。

Figure 5 Related information of 373 strains of *epidermidis staphylococcus* drug resistance genes. A: The number of resistance genes between strains from different isolates; B: Heat map of the presence and deletion of antimicrobial resistance genes in 373 strains of *Staphylococcus epidermidis* (0 represents missing and 1 represents present).

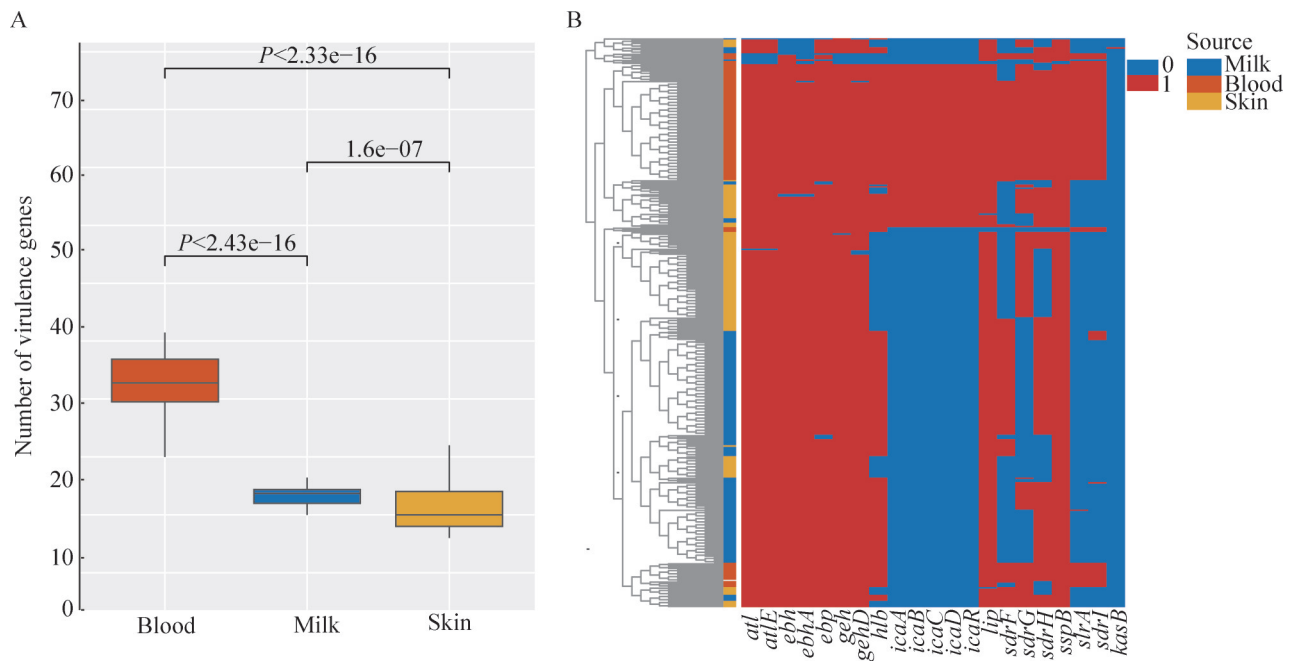


图6 373株表皮葡萄球菌毒力基因相关信息。A: 不同分离源菌株在毒力基因数量上差异分析; B: 373株表皮葡萄球菌毒力因子存在与缺失热图; 0代表缺失, 1代表存在。

Figure 6 Related information of 373 strains of *Staphylococcus epidermidis* virulence genes. A: The differences in the number of virulence genes between strains from different isolates; B: Heat map of the presence and deletion of virulence factors in 373 strains of *S. epidermidis*; 0 represents missing and 1 represents present.

显示, 3种分离源菌株携带毒力基因数量的差异显著($P < 0.05$), 其中血液源菌株携带量最高, 而母乳源菌株最低。血液源、皮肤源和母乳源菌株均含有数量不等的 *icaA/B/C/D/R* 基因, 其中血液源和皮肤源菌株的该类基因携带率显著高于母乳源菌株($P < 0.05$)。表皮葡萄球菌主要分为侵袭型和共生型^[40], 而 *icaA/B/C/D/R* 基因与生物膜的形成有关, 是表皮葡萄球菌的重要判断标准致病因子。其中, 101株血液源菌株中76株携带 *icaA/B/C/D/R* (检出率为75.2%); 120株皮肤源菌株中21株携带该基因(检出率为17.5%); 而152株母乳源菌株中仅有5株携带该基因(检出率为3.2%), 即母乳源菌株在生物膜生成功能上低于血液源和皮肤源菌株。此外, *slrA* 在血液源分离株中的携带率为100.0%, 而在皮肤源和母乳源菌株中未被检测到。*slrA* 作为一种黏附基因, 可编码多种表面蛋白, 是重要

的毒力因子, 涉及细菌对宿主细胞上皮细胞的黏附^[41]。它通过识别宿主细胞表面的黏附基质分子, 促进细菌黏附和组织定殖, 从而引发感染。上述结果表明, 血液源表皮葡萄球菌的黏附性和定殖能力高于皮肤源和母乳源菌株。

3 讨论与结论

表皮葡萄球菌广泛存在于皮肤、母乳以及血液中, 母乳中的细菌对婴幼儿肠道初始菌群的建立及免疫力的提高起到至关重要的作用。然而, 目前关于母乳源表皮葡萄球菌的遗传背景和功能基因的研究相对较少。本研究通过对3种分离源共373株表皮葡萄球菌进行比较基因组学研究, 发现不同分离源的表皮葡萄球菌在诸多方面存在显著差异。系统发育树结果显示, 373株表皮葡萄球菌可分为2个分支且呈现聚集特性, 其中体内分离源(母乳源和血液源)菌株的

亲缘关系更近。表皮葡萄球菌为适应不同环境而发生了适应性进化,主要体现在基因组大小、CDs 数量、附属基因、毒力因子及耐药基因等方面。在毒力因子和耐药基因分析方面,3种分离菌株携带毒力因子和耐药基因的数量存在显著差异,均呈现血液源菌株最高、母乳源菌株最少的特点。在生物膜合成相关基因 *icaA/B/C/D/R* 上,母乳源菌株的携带率最低(3.2%),皮肤源菌株次之(17.5%)而血液源菌株最高(75.2%)。本研究结果表明,母乳源表皮葡萄球菌相对安全,且表皮葡萄球菌为适应母乳环境发生了适应性进化。

作者贡献声明

赵乾:参与实验方法设计,实际调查研究,实验结果可视化,论文初稿撰写,数据整理与管理;李伟程:参与实验方法设计,软件开发与程序设计;李瑜:研究项目管理;孙佳琦:研究项目管理;钟智:研究资源采集;张和平:研究概念生成,研究资源采集,实验设计验证与核实,研究课题监管与指导,论文审阅与修订,研究项目管理。

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] 屈平华. 人体皮肤微生物多样性与皮肤型及益生菌治疗特应性皮炎的功能潜力[D]. 广州: 广州中医药大学博士学位论文, 2023.
QU PH. Human skin microbial diversity, cutotypes and functional potential of key probiotic microbe for treating eczema of atopic dermatitis[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of Guangzhou University of Chinese Medicine, 2023 (in Chinese).
- [2] 赵丽霞, 刘文俊. 母乳中乳酸菌多样性及益生菌开发利用研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2024, 43(4): 25-34.
ZHAO LX, LIU WJ. Research progress on diversity of lactic acid bacteria and probiotics exploitation in breast milk[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(4): 25-34 (in Chinese).
- [3] AHRODIA T, DAS S, BAKSHI S, DAS B. Structure, functions, and diversity of the healthy human microbiome[J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2022, 191(1): 53-82.
- [4] CONSTANTINIDES MG, LINK VM, TAMOUTOUNOUR S, WONG AC, PEREZ-CHAPARRO PJ, HAN SJ, CHEN YE, LI K, FARHAT S, WECKEL A, KRISHNAMURTHY SR, VUJKOVIC-CVIJIN I, LINEHAN JL, BOULADOUX N, MERRILL ED, ROY S, CUA DJ, ADAMS EJ, BHANDoola A, SCHARSCHMIDT TC, et al. MAIT cells are imprinted by the microbiota in early life and promote tissue repair[J]. Science, 2019, 366(6464): eaax6624.
- [5] ZHENG Y, HUNT RL, VILLARUZ AE, FISHER EL, LIU R, LIU Q, CHEUNG GYC, LI M, OTTO M. Commensal *Staphylococcus epidermidis* contributes to skin barrier homeostasis by generating protective ceramides[J]. Cell Host & Microbe, 2022, 30(3): 301-313. e9.
- [6] SEVERN MM, HORSWILL AR. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection[J]. Nature Reviews Microbiology, 2023, 21(2): 97-111.
- [7] 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.
- [8] MARTÍN R, HEILIG HG, ZOETENDAL EG, JIMÉNEZ E, FERNÁNDEZ L, SMIDT H, RODRÍGUEZ JM. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women[J]. Research in Microbiology, 2007, 158(1): 31-37.
- [9] TOGO A, DUFOUR JC, LAGIER JC, DUBOURG G, RAOULT D, MILLION M. Repertoire of human breast and milk microbiota: a systematic review[J]. Future Microbiology, 2019, 14(7): 623-641.
- [10] JÄRVINEN KM, MARTIN H, OYOSHI MK. Immunomodulatory effects of breast milk on food allergy[J]. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2019, 123(2): 133-143.
- [11] ZHU H, QU F, ZHU LH. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(22): 5279-5280.
- [12] MO LX, YU J, JIN H, HOU QC, YAO CQ, REN DY, AN XN, TSOGTGEREL T, ZHANG HP. Investigating the bacterial microbiota of traditional fermented dairy products using propidium monoazide with single-molecule real-time sequencing[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(5): 3912-3923.
- [13] BOLGER AM, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [14] LUO RB, LIU BH, XIE YL, LI ZY, HUANG WH, YUAN JY, HE GZ, CHEN YX, PAN Q, LIU YJ, TANG

- JB, WU GX, ZHANG H, SHI YJ, LIU Y, YU C, WANG B, LU Y, HAN CL, CHEUNG DW, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler[J]. *GigaScience*, 2012, 1(1): 18.
- [15] PARKS DH, CHUVOCHINA M, WAITE DW, RINKE C, SKARSHEWSKI A, CHAUMEIL PA, HUGENHOLTZ P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(10): 996-1004.
- [16] PARKS DH, IMELFORT M, SKENNERTON CT, HUGENHOLTZ P, TYSON GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes[J]. *Genome Research*, 2015, 25(7): 1043-1055.
- [17] JAIN C, RODRIGUEZ-R LM, PHILLIPPY AM, KONSTANTINIDIS KT, ALURU S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 5114.
- [18] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE YH, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [19] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [20] PAGE AJ, CUMMINS CA, HUNT M, WONG VK, REUTER S, HOLDEN MTG, FOOKES M, FALUSH D, KEANE JA, PARKHILL J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(22): 3691-3693.
- [21] ZHAO YB, JIA XM, YANG JH, LING YC, ZHANG Z, YU J, WU JY, XIAO JF. PanGP: a tool for quickly analyzing bacterial pan-genome profile[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(9): 1297-1299.
- [22] PRICE MN, DEHAL PS, ARKIN AP. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2009, 26(7): 1641-1650.
- [23] HUERTA-CEPAS J, SZKLARCZYK D, HELLER D, HERNÁNDEZ-PLAZA A, FORSLUND SK, COOK H, MENDE DR, LETUNIC I, RATTEI T, JENSEN LJ, VON MERING C, BORK P. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D309-D314.
- [24] JIA BF, RAPHENYA AR, ALCOCK B, WAGLECHNER N, GUO PY, TSANG KK, LAGO BA, DAVE BM, PEREIRA S, SHARMA AN, DOSHI S, COURTOT M, LO R, WILLIAMS LE, FRYE JG, ELSAYEGH T, SARDAR D, WESTMAN EL, PAWLOWSKI AC, JOHNSON TA, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D566-D573.
- [25] CHEN LH, YANG J, YU J, YAO ZJ, SUN LL, SHEN Y, JIN Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(Database issue): D325-D328.
- [26] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(1): 127-128.
- [27] BOWERS RM, KYRPIDES NC, STEPANAUSKAS R, HARMON-SMITH M, DOUD D, REDDY TBK, SCHULZ F, JARETT J, RIVERS AR, ELOE-FADROSH EA, TRINGE SG, IVANOVA NN, COPELAND A, CLUM A, BECRAFT ED, MALMSTROM RR, BIRREN B, PODAR M, BORK P, WEINSTOCK GM, et al. Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(8): 725-731.
- [28] 彭文静, 曹云. 母乳微生态及其研究进展[J]. *中华围产医学杂志*, 2018, 21(7): 483-486.
- PENG WJ, CAO Y. Research progress in human breast milk microecology[J]. *Chinese Journal of Perinatal Medicine*, 2018, 21(7): 483-486 (in Chinese).
- [29] XIAO Y, ZHAO JX, ZHANG H, ZHAI QX, CHEN W. Mining genome traits that determine the different gut colonization potential of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species[J]. *Microbial Genomics*, 2021, 7(6): 000581.
- [30] RICHTER M, ROSSELLÓ-MÓRA R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(45): 19126-19131.
- [31] ARAHAL DR. WHOLE-GENOME Analyses: average nucleotide identity[J]. *Methods in Microbiology*, 2014, 41(6): 103-122.
- [32] 代学雷. 中国瘤牛的泛基因组构建及其适应性渗入研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2023.
- DAI XL. Pangenome construction and adaptive introgression of Chinese Indicine Cattle[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2023 (in Chinese).
- [33] BYRD AL, BELKAID Y, SEGRE JA. The human skin microbiome[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(3): 143-155.
- [34] STINSON LF, SINDI ASM, CHEEMA AS, LAI CT, MÜHLHÄUSLER BS, WLODEK ME, PAYNE MS, GEDDES DT. The human milk microbiome: who, what, when, where, why, and how?[J]. *Nutrition Reviews*, 2021, 79(5): 529-543.
- [35] 吴艳蓉, 梁跃波. 新生儿败血症抗生素治疗研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2021, 37(16): 2757-2760.
- WU YR, LIANG YB. Research progress of antibiotic therapy for neonatal septicemia[J]. *Journal of Modern Medicine & Health*, 2021, 37(16): 2757-2760 (in Chinese).
- [36] 叶亚菲, 夏忠弟, 邓俊, 李一柯, 范志茹. *norA* 基因 mRNA 表达水平与表皮葡萄球菌氟喹诺酮耐药性的关系[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(11): 2041-2043.
- YE YF, XIA ZD, DENG J, LI YK, FAN ZR. The relationship between mRNA expression levels of *norA*

- gene in *Staphylococcus epidermidis* and fluoroquinolones resistance[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, 9(11): 2041-2043 (in Chinese).
- [37] BOTH A, HUANG JB, QI MY, LAUSMANN C, WEIBELBERG S, BÜTTNER H, LEZIUS S, FAILLA AV, CHRISTNER M, STEGGER M, GEHRKE T, BAIG S, CITAK M, ALAWI M, AEPFELBACHER M, ROHDE H. Distinct clonal lineages and within-host diversification shape invasive *Staphylococcus epidermidis* populations[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(2): e1009304.
- [38] 张慧芬, 李基明, 谢辉, 张晓岚. 新生儿败血症的菌株及耐药性分析[J]. *中国生育健康杂志*, 2016, 27(3): 256-258.
- ZHANG HF, LI JM, XIE H, ZHANG XL. Strains and drug resistance analysis of neonatal sepsis[J]. *Chinese Journal of Reproductive Health*, 2016, 27(3): 256-258 (in Chinese).
- [39] 王秀娟, 谷宇锋, 王文惠, 李洁, 郝海红. 细菌抵抗消毒剂及其对抗生素共耐药[J]. *微生物学报*, 2023, 63(8): 2967-2979.
- WANG XJ, GU YF, WANG WH, LI J, HAO HH. Bacterial resistance to disinfectants and their co-resistance to antibiotics[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(8): 2967-2979 (in Chinese).
- [40] 叶联华, 黄云超, 杨达宽, 赵光强, 刘馨, 郭凤丽, 周友全. 表皮葡萄球菌 *ica* 操纵子与聚氯乙烯材料表面细菌生物膜形成的关系[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(24): 3841-3843.
- YE LH, HUANG YC, YANG DK, ZHAO GQ, LIU X, GUO FL, ZHOU YQ. Relationship between *ica* operon of iatrogenic *Staphylococcus epidermidis* and formation of bacterial biofilm on surface of polyvinyl chloride[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2010, 20(24): 3841-3843 (in Chinese).
- [41] HERMANS PW, ADRIAN PV, ALBERT C, ESTEVAO S, HOOGENBOEZEM T, LUIJENDIJK IH, KAMPHAUSEN T, HAMMERSCHMIDT S. The streptococcal lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonization[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(2): 968-976.