

文章编号: 1674-5566(2020)03-0411-09

DOI:10.12024/j.sou.20190502646

金黄色葡萄球菌一氧化氮合酶生理功能分析

吴从文^{1,2}, 鲍宝龙^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为了研究金黄色葡萄球菌一氧化氮合酶的功能和作用, 克隆该基因的全长序列, 在一氧化氮合酶基因缺陷菌株的基础上, 构建一氧化氮合酶过表达菌株, 进行表型验证, 研究 NO 对细菌表型的影响。结果显示: 一氧化氮合酶缺失使细菌自溶速率加快, 抗氧化杀伤能力减弱, 生物被膜生成能力降低, 缺失和过表达均会影响细菌正常的生长周期和速率。外源性 NO 对野生菌株、敲除菌株和过表达菌株生物被膜有不同影响显示, 金黄色葡萄球菌一氧化氮合酶还参与了外源性 NO 对生物被膜的调控。一系列表型结果表明: 金黄色葡萄球菌内源性 NO 作用不仅仅阻断 Fenton 反应、增强过氧化氢酶活性, 还可以作为一种信号分子调控细菌基因的转录和表达。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 一氧化氮合酶; 抗氧化杀伤; 生长速率; 自溶; 生物被膜

中图分类号: S 931.1 **文献标志码:** A

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是皮肤、软组织和血液感染的主要病原菌之一, 导致局部或全身性的多种感染^[1], 其严重程度从皮肤脓肿和伤口感染到深部组织脓肿, 如肺炎、中毒性休克综合征^[2-3]。

在哺乳动物中, 一氧化氮 (NO) 参与许多生物过程, 从血压调节到机体对病原体免疫应答^[4]。细菌突破黏膜屏障入侵宿主细胞, 宿主吞噬细胞响应病原体感染而产生大量的 NO、活性氧和氮物质。一方面, NO 可以直接抑制病原菌的有氧呼吸和能量代谢, 并抑制细菌的 DNA 复制^[5]; 另一方面, NO 在与自由基中超氧离子反应时, 会生成强杀菌复合物过氧硝酸盐, 进而起到抗菌作用。然而, 金黄色葡萄球菌一氧化氮合酶 (*S. aureus nitric oxide synthase*, saNOS) 基因缺失实验表明 saNOS 为致病菌提供抗氧化杀伤的保护功能。在感染的早期阶段, 细菌内源性 NO 保护细菌来自宿主的杀伤, 但宿主也产生 NO, 作为其

自身保护性氧化杀伤的组分^[6]。

关于这种宿主-病原体相互作用中 NO 所起的精确调控成为当下研究的热点。NO 在参与宿主和病原信号级联反应中间接影响病原菌的感染, 在杀伤和清除入侵的病原菌及在炎症反应方面起着十分重要的作用^[7]。然而, 细菌内源性 NO 和哺乳动物产生的 NO 起着不同的功能和作用, 链霉菌 (*Streptomyetaceae*) 内源性 NO 参与植物毒素合成, 亚硝化单胞菌 (*Nitroso monas*) NO 在调控细菌生长代谢中作为信号分子, 金黄色葡萄球菌 NO 抗生素敏感性实验表明细菌的 NOS 还可能是抗生素良好的靶标^[8-9]。此外, 外源性 NO 影响金黄色葡萄球菌生物被膜的合成, 但是关于 saNOS 是否可以感应外源性 NO 并进行适应性调控仍需要进一步的证据^[10]。

为了进一步探究 saNOS 的功能, 本研究利用质粒构建了 *nos* 过表达菌株, 并比较野生型菌株、*nos* 缺失突变株和过表达菌株的表型差异。

收稿日期: 2019-05-13 修回日期: 2019-09-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31872546)

作者简介: 吴从文 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: 529049548@qq.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 购自天根生化科技有限公司,金黄色葡萄球菌 RN4220 是限制性核酸内切酶缺陷菌株,可以接受并修饰外来的质粒 DNA,购自北京派瑞金生物科技有限公司。金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 标准菌株从中国工业微生物种保藏管理中心订购,金黄色葡萄球菌 29213 *nos* 缺失突变株 (*nos* mutant, Δnos) 为本实验室构建。单拷贝整合质粒 pLI50 购自武汉森灵生物科技有限公司。培养大肠杆菌和金黄色葡萄球菌所用的 Luria-Bertani 培养基 (LB) 和胰酪胨大豆肉汤培养基 (Trypticase Soy Broth, TSB) 为实验室自制,脑心浸液肉汤 (Brain Heart Infusion Broth, BHI) 培养基购自青岛海博生物技术有限公司。

1.1.2 试剂

蛋白酶 K 购自德国 Merck 公司,革兰氏阳性菌质粒大量提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,PCR Purification Kit 购自 QIAGEN。溶菌酶、溶葡萄球菌酶、蔗糖、氨苄青霉素和氯霉素从生工生物工程 (上海) 股份有限公司订购。BP clonase II 酶和 *EcoR* I, *BamH* I 内切酶购自 Thermo Fisher Scientific 公司。过氧化氢酶购自 Sigma-Aldrich 公司,RNAPrep pure 细菌总 RNA 提

取试剂盒,质粒小提中量试剂盒及普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技有限公司。亚硝基铁氰化钠和结晶紫 (Crystal violet) 购自上海兰拓生物科技有限公司。

1.2 过表达载体 pLI50-*nos* 的构建

pLI50 质粒是一个金黄色葡萄球菌单拷贝整合载体,在大肠杆菌内具有氨苄抗性,在金黄色葡萄球菌内具有氯霉素抗性。以金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 基因组 DNA 为模板,通过 Primer Premier 6,设计 29213 *nos* 基因及上游启动子区域的引物,命名为 pLI50-*nos*-F 和 pLI50-*nos*-R (表 1),PCR 扩增 *nos* 及其启动子序列。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min,共 35 个循环。PCR 产物纯化后和 pLI50 质粒分别用 *BamH* I 和 *EcoR* I 双酶切 (37 $^{\circ}\text{C}$, 2 h),琼脂糖电泳后用凝胶回收试剂盒割胶回收。使用 NANODROP 2000 分别测定 PCR 产物和 pLI50 质粒回收的浓度,以 3:1 (PCR 产物:质粒) 的摩尔浓度比在 T4 接酶作用下 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜^[11]。连接产物转化 *E. coli* DH5 α ,氨苄 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) LB 平板上挑取单菌落,扩增菌株并提取质粒^[12]。从 pLI50 的 *BamH* I 和 *EcoR* I 酶切位点上下游设计引物 pLI50-ZY-F 和 pLI50-ZY-R,通过 PCR 验证插入片段大小,测序验证序列。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保持,共 35 个循环。

表 1 实验中所用的 PCR 引物

Tab. 1 PCR primers used in the experiment

引物 Primers	引物序列 Primer sequence	酶切位点 Restriction site	长度 Length/bp	用途 Introduction
pLI50- <i>nos</i> -F	CGCGGATCCTTGACGAATTCTACTAGCCT	<i>BamH</i> I	1 704	<i>nos</i> 基因和启动子序列扩增 Amplification of <i>nos</i> gene and its promoter sequence
pLI50- <i>nos</i> -R	GCCGGAATTCCTTAATGATGAAAGGGCACTGG	<i>EcoR</i> I		
pLI50-ZY -F	GGTCTTCTCAACGCACAATAA		2 266	插入片段验证 Verify the size of the insert on the plasmid
pLI50-ZY -R	GAATAAGGGCGACACCGGA			
RT- <i>nos</i> -F	AGCACGCCATTATCTCCAACATT		124	<i>nos</i> 基因表达水平 Detection of relative transcription levels of the <i>nos</i> gene
RT- <i>nos</i> -R	ATGATGAAAGGGCACTGGTTAGC			

1.3 过表达质粒的电转化

野生型的金黄色葡萄球菌不能接受来自革兰氏阴性菌的质粒,敲除载体需先导入金黄色葡萄球菌 RN4220 中进行修饰。金黄色葡萄球菌的感受态的制备参考文献 [13] 中的步骤,10 μL 的 100 ~ 300 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的质粒加入 160 μL 的金黄色葡

萄球菌 RN4220 感受态细胞中,轻弹混匀,加入预冷的电击杯中,冰上孵育 15 min。参照文献 [14] 中的电击参数,用电转仪电击感受态细菌,参数为:电压 2.5 kV,电阻 200 Ohms,电容 25 μF 。电击后,立即加入 1 mL BHI 培养基到电击杯中,充分混合之后吸出移入到 EP 管中,30 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养

2 h (120 ~ 150 r/min), 吸取 100 μ L 涂在 10 μ g/mL 氯霉素的 TSA 板上, 30 $^{\circ}$ C 培养箱静置培养 2 d (30 $^{\circ}$ C 细菌基因组可以稳定遗传不容易发生变异)。用 10 μ g/mL 氯霉素 (chl-10) 将细胞铺在 TSA 上^[15], 在 30 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育平板。30 $^{\circ}$ C 在 3 mL TSB (chl-10) 中培养转化的 RN4220, 溶葡萄球菌酶 37 $^{\circ}$ C 处理 1 h 溶解细胞壁, 提取质粒, 并在琼脂糖凝胶上检查质粒。确认质粒完好, 将经 RN4220 修饰的质粒电穿孔到目标菌株 Δnos 中, 操作步骤同上。在 30 $^{\circ}$ C 培养转化的目标菌株, 提取纯化质粒, 然后在琼脂糖凝胶上检查质粒。

1.4 金黄色葡萄球菌 *nos* 基因过表达菌株鉴定

1.4.1 PCR 鉴定

为了筛选 *nos* 过表达菌株, 分别以 6 个待筛选的菌株的质粒 DNA 为模板, 采用 pLI50-ZY-F 和 pLI50-ZY-R 为引物进行 PCR 扩增, 筛选出的 *nos* 过表达菌株命名为 Δnos -pLI50-*nos*。

1.4.2 荧光定量检测 *nos* 转录水平

反转录样品适当稀释为模板, 每个样品 3 个平行, 采用默认的 PCR 程序, 进行定量 PCR 检测, 分析 *nos* 基因的相对表达量 (以野生型菌株 WT 转录水平为 1, 测定 Δnos 和 Δnos -pLI50-*nos* 的转录水平)。内参基因选择 16S rDNA, 计算并取平均 Ct 值, 以 ATCC 29213 中的 *nos* 基因扩增的 Ct 值为基准值^[10], 计算 Δnos -pLI50-*nos* 中 *nos* 的相对表达量。

1.5 内源性 NO 对生长速率的影响

将保种的菌液在新制的 TSA 板上划线。37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 12 ~ 16 h, 分别挑取 WT 和 Δnos 各 3 个单菌落, 接种到 TSB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床中震荡培养 (200 ~ 300 r/min)。将过夜生长的菌液转接到含有 50 mL TSB 的 250 mL 锥形瓶, 初始 OD 值均为 0.05, WT 和 Δnos 菌株各接种 3 瓶 (37 $^{\circ}$ C, 200 r/min)^[16]。测定每小时各瓶菌液 OD₆₀₀ 值, 并结合活菌平板菌落计数法测定培养中细菌浓度^[17], 直至稳定期吸光度不再变化。采用 GraphPad Prism v 5.0 软件, 以培养时间 *t* 为横坐标, 各实验组 3 个平行的活菌数的对数的均值为纵坐标绘制 WT 和 Δnos , *nos*-pLI50-*nos* 的生长曲线。根据文献中对比生长速率 μ (每小时单位质量的菌体所增加的菌体量) 的描述^[18], 以培养时间 *t* 为横坐标, $\ln 2$ 除以菌体倍增时间的均值为纵坐标, 绘制比生长速率曲线。两组曲线的数据均

使用 *T* 检验测定显著性差异。

1.6 Triton X-100 诱导的自溶分析

使 WT 和 Δnos 在 TSB 中于 37 $^{\circ}$ C 振荡至 OD₆₀₀ 为 1.2 至 1.3^[19-20], 然后将细菌培养物以 1:100 进行传代稀释。新鲜 TSB 含有 1 mol/L NaCl, 并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育至 OD₆₀₀ 为 0.6 ~ 0.8。通过 5 000 mol/L 离心 5 min 收获细菌细胞, 用预冷的无菌去离子洗细胞, 重复操作两次^[21]。并重悬于相同体积的缓冲液中含有 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 和 0.1% Triton X-100。然后将细菌细胞在 30 $^{\circ}$ C 下振荡温育, 并测量 OD₆₀₀ 的变化。结果在零时刻 (OD₀) 标准化为 OD₆₀₀, 即每个阶段裂解的百分比 = $[(OD_0 - OD_t) / OD_0] \times 100$ ^[20], 过 30 min 测量 1 次 OD₆₀₀ 的值, 所有实验组设置 3 个平行。

1.7 过氧化氢杀灭试验

在 H₂O₂ 处理之前, 将 WT 和 Δnos 菌株在阴离子调节的 Mueller-Hinton 肉汤 (CAMHB) 中培养过夜 (37 $^{\circ}$ C, 200 r/min)。并在新鲜的 CAMHB 中以 2% 稀释进行传代培养^[9]。使菌株生长至对数中期 (OD₆₀₀ \approx 0.6), 通过离心沉淀, 在 PBS 中重悬两次, 并在 CAMHB 中稀释至预定浓度, 密度接近 2×10^7 cfu/mL。将 25 μ L (约 5×10^5 cfu) 的菌液加入以 200 μ L 等体积的 CAMHB 和含 30 mmol/L H₂O₂ 的 CAMHB。在 37 $^{\circ}$ C, 低速 (120 r/min) 孵育 20 min, 40 min。样品将其在 PBS 中稀释并涂布在 TSB 琼脂板上进行计数, 稀释液中含有 2 500 U/mL 过氧化氢酶以进行猝灭残留的 H₂O₂, 孵育平板过夜, 通过计数计算培养物 cfu/mL 菌落并乘以稀释因子^[22]。所有条件为一式 3 份取样, 显示的值为平均值 \pm 标准差 (SD)。统计分析在 (IBM SPSS Statistics 22) 中使用 Student *t* 检验进行。NO 抑制剂 L-NNA 对 H₂O₂ 杀伤的影响: H₂O₂ 处理前准备步骤 H₂O₂ 杀灭实验相同。25 μ L 菌液分别加入等体积的 CAMHB, 含 10 mmol/L L-NNA 的 CAMHB, 10 mM H₂O₂ 的 CAMHB, 10 mmol/L H₂O₂ 和 L-NNA 的 CAMHB 中。涂板、计数及分析方法同上所述。

1.8 结晶紫染色法检测静态生物被膜

取 TSB 平板上单克隆接入 TSB 中, 摇床中 37 $^{\circ}$ C 过夜培养 (200 r/min)^[23]。用 TSB 稀释菌液 (1% 体积), 测定 OD₅₉₀ 的数值。用 TSB 稀释菌液, 使 OD₅₉₀ 到 0.01。96 微孔板中每孔加入 100

μL 稀释菌液,避免液体残留在臂边缘,用湿布沿孔板边缘包裹,37 °C 培养 24 h。用 150 μL PBS 无菌溶液处理 3 次(用 25% 甲醛固定 10 min,吸出液体自然风干),200 μL 1% 结晶紫染色 10 min^[24]。吸出结晶紫染液后,用无菌生理盐水缓慢冲洗残余的染料,至溶液无色,吸出残液,超净台下吹干。干燥彻底后,每个样孔加入 100 μL 33% 冰醋酸液体,20 min 以溶解结晶紫^[25];590 nm 测定吸光度,用酶标仪测量样品孔中液体的 OD 数值;每种菌株设 4 个平行组。

1.8.1 外源性 NO 对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的影响

为了研究 NO 对金黄色葡萄球菌生物被膜的影响,培养基中加入不同浓度的 NO 供体 SNP,检测外源 NO 其对被膜生成的作用。按照之前所述的生物被膜检测方法,在稀释后的菌液中加入 1 mol/L 的 SNP 浓溶液至终浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$,检测生物被膜的变化。

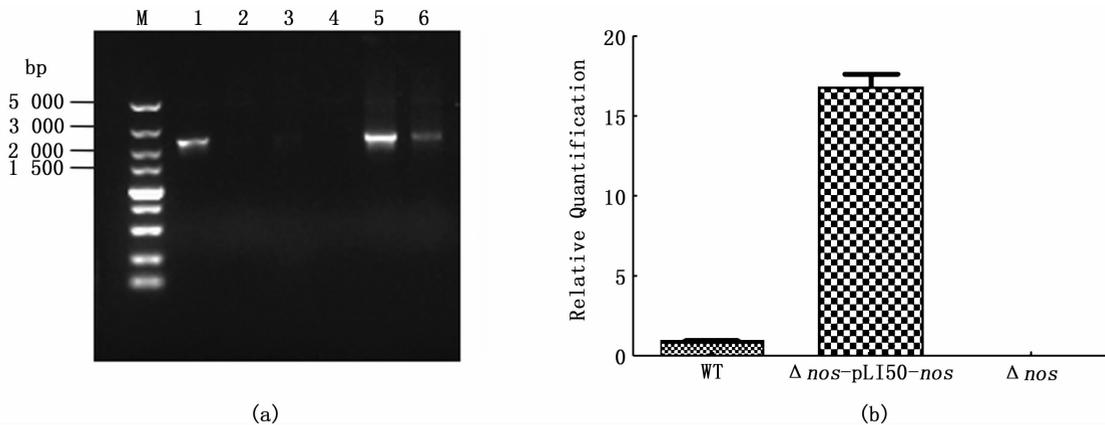
1.8.2 内源性 NO 对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的影响

按照所述的方法,检测 WT、 Δnos 和 Δnos -pLI50-*nos* 静置培养后生物被膜的变化,统计分析方法同上。

2 结果与分析

2.1 过表达菌株的鉴定

以过表达质粒为模板,通过位于质粒酶切位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I 两端的引物进行 PCR,成功插入 *nos* 基因起启动子区域的质粒 PCR 片段大小为 2 266 bp(1 704 bp 加质粒上的 562 bp)。6 株待筛选菌株有两株成功转入了过表达质粒,如图 1a 所示。荧光定量结果如图 1b 所示, Δnos -pLI50-*nos* 中 *nos* 基因成功表达,表达量接近野生菌株 WT 的 18 倍,证明在 Δnos 菌株过表达成功,可以作为过表达菌株用于进一步检测内源性 NO 对金黄色葡萄球菌的作用。



(a) *nos* 基因 PCR 检测,1~5 泳道为 Δnos -pLI50-*nos* 菌株,6 泳道是以 WT 基因组 DNA 为模板的阳性对照;(b) 荧光定量测定 3 种菌株 *nos* 的表达量

(a) *nos* gene PCR detection, lanes 1 to 5 were Δnos -pLI50-*nos* strain, and lane 6 was a positive control using WT genomic DNA as a template; (b) Fluorescence quantitative determination of the expression level of *nos* gene of three strains

图 1 *nos* 过表达菌株 Δnos -pLI50-*nos* 的 PCR 和 Real-Time PCR 检测

Fig. 1 PCR and Real-Time PCR detection of *nos* in over-expression strain Δnos -pLI50-*nos*

2.2 内源性 NO 对生长速率的影响

由图 2 可知,同等的接种量,WT 与 Δnos 菌株相比,WT 在 1~3 h 细菌浓度均高于 Δnos 菌株 ($P < 0.05$),在 3 h 时浓度差值达到最大 ($P < 0.001$)。WT 与过表达菌株相比 Δnos -pLI50-*nos*,仅在 3 h 时 WT 菌株明显高于过表达菌株 ($P < 0.001$)。3 种菌株都在培养 6 h 左右细菌浓度接

近最大值,进入稳定期。

为了进一步了解 3 株细菌各时间段生长速率的差异,排除接种量的细微差异对实验结果造成的干扰,本实验检测野生菌 WT、*nos* 缺失菌 Δnos 和过表达菌株 Δnos -pLI50-*nos* 的比生长速率(图 3)。结果显示,WT 在 1 h 时比生长速率接近最大值,1~3 h 维持在 0.95 左右,随后比生长速

率开始下降,6 h 比生长速率接近 0。 Δnos 菌株在 0~3 h 比生长速率均低于 WT,3~4 h 比生长速率再次提高并在 4 h 时达到最大值,接近 WT 的最大比生长速率,随后开始降低。过表达菌株 0~2 h 比生长速率持续增加,并在 2 h 是达到最大值(明显高于 WT),2~3 h 比生长速率急剧下降,3 h 的比生长速率比 2 h 下降了 3.83 倍,3~4 h 比生长速率回升,之后持续降低。

总而言之,内源性 NO 缺失和过表达均导致金黄色葡萄球菌在迟缓期和对数期比生长速率(倍增时间)剧烈地上下波动,过表达造成的影响更大。

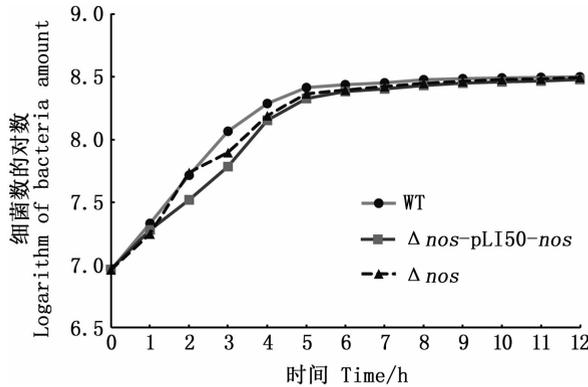


图2 WT, Δnos , Δnos -pLI50-*nos* 生长曲线
Fig.2 WT, Δnos , Δnos -pLI50-*nos* growth curve

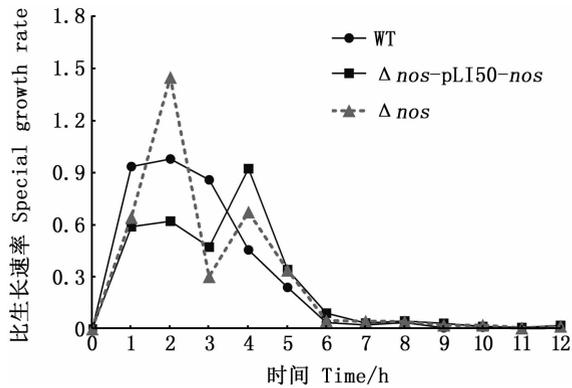


图3 WT, Δnos , Δnos -pLI50-*nos* 比生长速率
Fig.3 WT, Δnos , Δnos -pLI50-*nos* specific growth rate

2.3 内源性 NO 对自溶的影响

如图 4 所示, Δnos 菌株自溶率在各个时间段均高于野生菌株 WT。WT 在 8 h 左右时自溶速率基本不再发生变化, Δnos 比 WT 要推迟 1 h。从图 4,图 5 可以看出,0~60 min 自溶率差值在 3% 以内,90~150 min 差值一直维持在 11% 左右,180~270 min,随着 Δnos 自溶率接近最大值,

而 WT 自溶率趋于稳定,自溶率差值趋于减小,最终的自溶率差值为 4.143%。

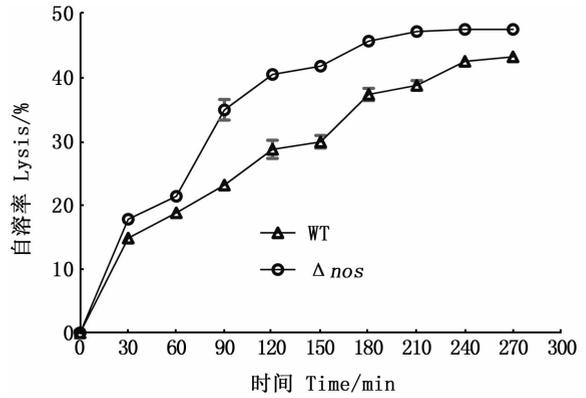
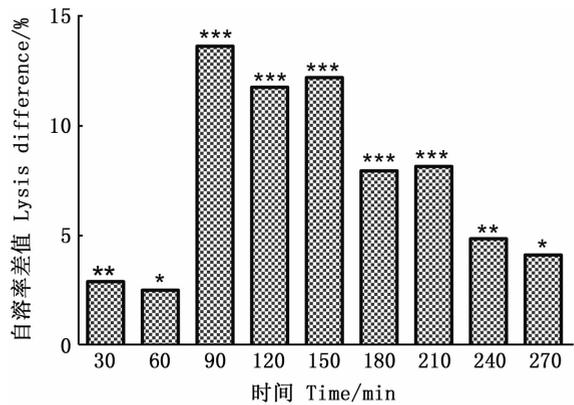


图4 Triton X-100 诱导条件下的野生菌株 (WT) 和 *nos* 缺失菌株 (Δnos) 的自溶率
Fig.4 Autolysis of wild and *nos*-deficient strains under Triton X-100 induction conditions



自溶率差值为 *nos* 缺失菌株减野生型,数值为 3 个平行组的菌株 \pm 标准差, *t* 检验表明 *nos* 缺失菌株和野生菌株自溶率的显著性差异, * . $P < 0.05$; ** . $P < 0.01$; *** . $P < 0.001$

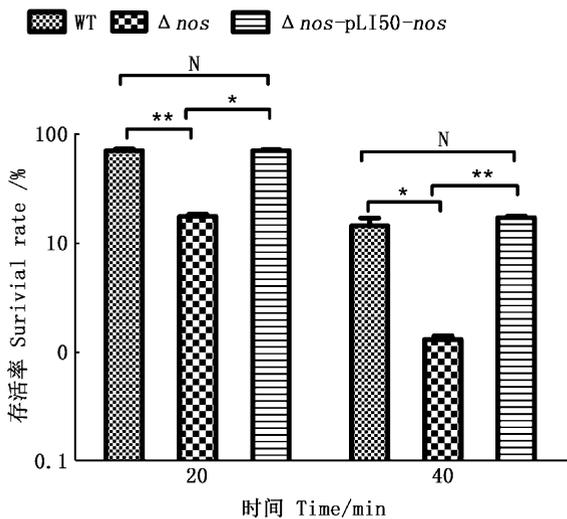
The difference of autolysis rate was *nos*-missing strain minus wild type, and the value was the strain of three parallel groups \pm standard deviation. The T test showed significant difference in autolysis rate of *nos*-deleted strain and wild strain, * . $P < 0.05$; ** . $P < 0.01$; *** . $P < 0.001$

图5 时间段 *nos* 缺失菌株和野生菌株自溶率的差值
Fig.5 Differences in autolysis rate between *nos*-deleted strains and wild strains in each time period

2.4 NOS 对细菌抗氧化杀伤的影响

如图 6 所示,与野生菌株 WT 相比较, H_2O_2 处理 20 min 后 Δnos 存活率为 WT 的 24.98%,处理 40 min 后存活率为 WT 的 9.11%。过表达菌株 Δnos -pLI50-*nos* 两个时间段的存活率与 WT 接近。随着 H_2O_2 杀伤时间的持续,saNOS 介导的

NO 保护作用越发的明显。



将对数期细菌暴露于 30 mmol/L H_2O_2 , 并通过连续稀释平板每 20 min 监测存活。误差线代表 3 次重复的平均值 \pm 标准差, T 检验表明显著性差异

Log phase bacteria were exposed to 30 mmol/L H_2O_2 , and survival was monitored every 20 min by serial dilution plating. Error bars represent the mean \pm SD deviation of three replicates, and the T test shows significant differences

图 6 不同 NOS 表达水平细菌的氧化应激的存活率

Fig. 6 Survival rate of bacteria with different NOS expression levels under oxidative stress

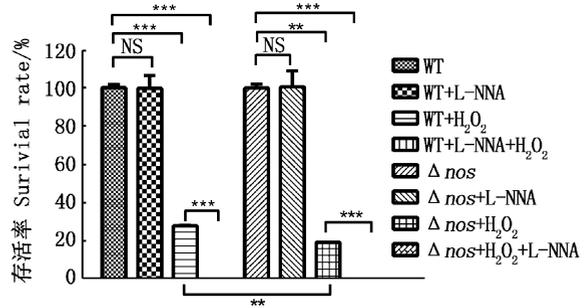
2.5 L-NNA 对过氧化氢杀伤影响

从图 7 可以看出单独用二氧化氮合酶抑制剂 L-NNA 处理金黄色葡萄球菌时, 无论是野生型 WT 或是 Δnos 均未表现出细胞毒性, 但和 H_2O_2 一起处理时, 可以显著增强 H_2O_2 的氧化杀伤作用。L-NNA 增强 H_2O_2 杀伤金黄色葡萄球菌在 WT 和 Δnos 中都存在显著效果。

2.6 NO 对生物被膜的影响

2.6.1 内源性 NO 对生物被膜的影响

如图 8 所示, Δnos 和野生菌株 WT 所相比, 生物被膜生成能力减弱。用质粒对 nos 基因进行过表达之后, 被膜形成能力得到回复, 说明内源性 NO 对金黄色球菌生物被膜有加强作用。与内源性 NO 影响生长速率不同, nos 过表达并不会影响生物被膜的形成, 而且过表达菌株的成膜能力还有轻微的提升。



用 10 mmol/L H_2O_2 , 10 mmol/L L-NNA, 10 mmol/L H_2O_2 + L-NNA 处理 20 min 计算存活率。误差线代表 3 次重复的平均值 \pm 标准差, T 检验表明显著性差异

Survival was calculated by treatment with 10 mmol/L H_2O_2 , 10 mM L-NNA, 10 mmol/L H_2O_2 + L-NNA for 20 min. Error bars represent the mean \pm SD deviation of three replicates, and the T test shows significant differences

图 7 NOS 抑制剂 L-NNA 和 H_2O_2 对

不同 NOS 表达水平的细菌存活率的影响

Fig. 7 The effect of NOS inhibitors L-NNA and H_2O_2 on the survival rate of bacteria with different NOS expression levels

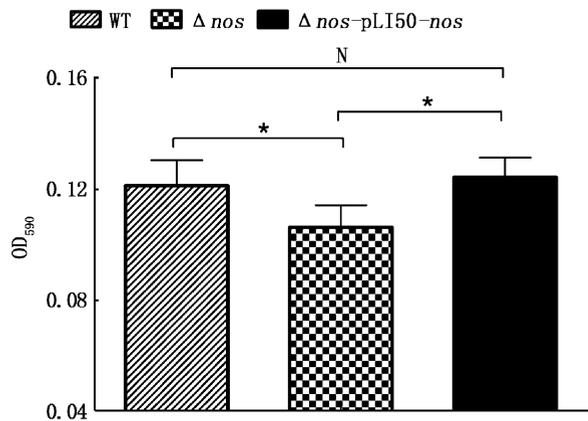


图 8 WT、 Δnos 、 Δnos -pLI50- nos

菌株生物被膜形成能力比较

Fig. 8 Comparison of WT, Δnos and Δnos replenishment biofilm formation ability

2.6.2 外源性 NO 对生物被膜的影响

目前大多数关于细胞 NOS 功能的报道都集中在 NO 的直接生物学作用上, 如氧化应激介导的 Fenton 反应上。为了验证 saNOS 是否影响外源 NO 介导的作用, 向培养基中添加 SNP, 检测 nos 缺失是否影响外源性 NO 对生物被膜的增进效果。

如图 9 所示,对野生菌株 WT,在 250 ~ 500 $\mu\text{mol/L}$ SNP 添加范围内,生物被膜的量随着 SNP 的提高而增加,表现出明显的 NO 抗性(NO 对细菌也是有细胞毒性的)。对于 Δnos 和过表达菌株,添加 250 $\mu\text{mol/L}$ 的 SNP 后生物被膜有明显增加,生物被膜的量明显高于野生菌株。但是当 SNP 浓度升高到 500 $\mu\text{mol/L}$ 时,生物被膜的量又明显下降,其中 Δnos 成膜能力降低到低于 WT 的水平。 Δnos 过表达菌株可能是因为 *nos* 基因在质粒上表达,内源性表达相对稳定,和 WT 基因组上 *nos* 的调控方式不同。

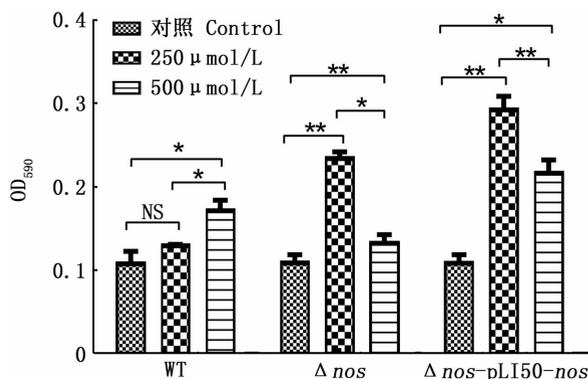


图 9 不同浓度 SNP 对 3 种菌株生物被膜的影响

Fig. 9 Effect of different concentrations of SNP on biofilm of three strains

3 讨论

金黄色葡萄球菌属于为数不多的拥有和 iNOS 同源物的革兰氏阳性菌^[26]。此外,金黄色葡萄球菌通过对毒力的转录适应从而对亚硝化应激,即外源 NO 具有相对抗性^[27-28]。目前的研究对内源 NO 一氧化氮的调控作用了解得很少,saNOS 的功能和作用也仅限于 NO 的直接生物学作用^[8],即充当细菌应激反应保护剂。本研究结果表明金黄色葡萄球菌 29213 内源性 NO 缺失和过表达并没有直接影响指数期的金黄色葡萄球菌的总体生长速率,但是细菌的比生长速率剧烈的上下波动,表明正常的生长周期被打乱,内源性 NO 不仅参与了细菌的生长周期的调控,还可以影响细菌从一个生长阶段向下一个阶段的转变^[29],推测金黄色葡萄球菌 NOS(saNOS)和哺乳动物 NOS(mNOS)一样是个严格调控表达的蛋白。自溶率实验结果表明内源性 NO 对金黄色葡萄球菌自溶的主要作用是抑制。WT 和 Δnos 出现的自溶率差值短暂的降低,可能是非 NO 依赖

性的自溶素基因调控系统短暂抑制了细菌的自溶。

先前已有实验室证明内源性 NO 保护 MRSA 减少 H_2O_2 引起的损伤,同样我们证明内源 NO 对甲氧西林敏感型菌株同样起保护作用。在本文中,*nos* 缺失的菌株对氧化应激的敏感性明显增加,通过质粒过表达 *nos* 基因菌株存活率恢复到 WT,但是 *nos* 过表达并不能提高细菌的抗氧化杀伤能力。

越来越多的研究表明内源性 NO 可以为病原菌提供抗氧化应激的保护机制,细菌 bNOS 也就成为了潜在药物靶标之一。本实验中,使用 L-NNA 作为 saNOS 抑制剂,结果表明 L-NNA 和 H_2O_2 的协同杀菌作用并不完全依赖抑制 NOS 的活性,推测 L-NNA 作为 L-Arg 类似物可能还可以抑制其它和抗氧化杀伤相关的酶,如过氧化氢酶或者 SOD。从另一个方面也表明 NO 并不是过氧化氢酶和 SOD 唯一的激活途径。*nos* 的缺失和过表达对细菌生物被膜的影响并不大,这与 saNOS 的催化能力较 mNOS 比较低的有关^[30]。有意思的是,*nos* 的缺失和过表达还显著影响外源性 NO 对生物被膜的作用,这些结果表明金黄色葡萄球菌可以共同选择宿主来源的 NO 来补充 bNOS 衍生的 NO 在与活化的吞噬细胞相遇时减轻活性氧应激带来的损伤^[31],更重要的是外源性 NO 对生物被膜的作用受到 saNOS 的调控,说明金黄色葡萄球菌通过感应外界环境的 NO 增加生物被膜的生成,从而逃避宿主的免疫攻击^[32],这对金黄色葡萄球菌是否能在宿主体类存活有重要作用。*nos* 的缺失和过表达对金黄色葡萄球菌生长周期调控、自溶速率、抗应激反应和生物被膜生成能力造成一系列影响,引起的表型变化类似于真核生物中 NO 调控引起的级联反应,表明金黄色葡萄球菌可以通过产生内源性 NO 和感应外源 NO 调整自身生长代谢,提高抗应激反应杀伤的能力,说明 NO 不仅作为金黄色葡萄球菌的一种保护剂,更是一种重要的信号分子。

参考文献:

- [1] 张明. 抗体-抗生素缀合物消灭金黄色葡萄球菌[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50(1): 90.
ZHANG M. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2016, 50(1): 90.

- [2] HORN J, STELZNER K, RUDEL T, et al. Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2018, 308(6): 607-624.
- [3] 张洪涛, 邵彬, 麻宏亮, 等. 降钙素原在恶性血液病发热中的诊断价值[J]. 临床肿瘤学杂志, 2008, 13(12): 1099-1104.
ZHANG H T, SHAO B, MA H L, et al. Procalcitonin in the differential diagnosis of the fever in hematological malignancies [J]. Chinese Clinical Oncology, 2008, 13(12): 1099-1104.
- [4] SUDHAMSU J, CRANE B R. Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for? [J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(5): 212-218.
- [5] 姜鹏, 路新枝, 侯方杰, 等. 金黄色葡萄球菌 *hmp* 基因缺失突变株的构建及抗一氧化氮能力分析[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 196-202.
JIANG P, LU X Z, HOU F J, et al. Construction of *Staphylococcus aureus* RN6390 *hmp* gene mutant and analysis of NO sensitivity [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 196-202.
- [6] HOLDENJK. Structural, biochemical, and biological studies on bacterial nitric oxide synthase [D]. Irvine: University of California, Irvine, 2015.
- [7] UEHARA E U, De STEFANOSHIDA B, DE BRITO C A. Role of nitric oxide in immune responses against viruses: beyond microbicidal activity [J]. Inflammation Research, 2015, 64(11): 845-852.
- [8] GUSAROV I, NUDLER E. NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(39): 13855-13860.
- [9] HOLDEN J K, LEWIS M C, CINELLI M A, et al. Targeting bacterial nitric oxide synthase with aminoquinoline-based inhibitors [J]. Biochemistry, 2016, 55(39): 5587-5594.
- [10] 侯方杰. 一氧化氮调节金黄色葡萄球菌生物被膜形成的作用机制探讨[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
HOU F J. Experimental study on the mechanism of nitric oxide in the regulation of *Staphylococcus aureus* biofilm formation [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010.
- [11] SPIROS. Regulators of bacterial responses to nitric oxide [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31(2): 193-211.
- [12] VAN SORGE N M, BEASLEY F C, GUSAROV I, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial nitric oxide synthase affects antibiotic sensitivity and skin abscess development [J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(9): 6417-6426.
- [13] SHANG F, XUE T, SUN H P, et al. The *Staphylococcus aureus* GGDEF domain-containing protein, GdpS, influences protein a gene expression in a cyclic diguanylic acid-independent manner [J]. Infection and Immunity, 2009, 77(7): 2849-2856.
- [14] 张晓静, 冯世源, 杜崇涛, 等. 金黄色葡萄球菌 *OatA* 基因敲除菌株及其回补菌株的构建 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(15): 2815-2819.
ZHANG X J, FENG S Y, DU C T, et al. Construction of *OatA* deletion mutant and complementation of *Staphylococcus aureus* [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(15): 2815-2819.
- [15] BAE T, SCHNEEWIND O. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection [J]. Plasmid, 2006, 55(1): 58-63.
- [16] 关玮琨. 基于假基因内插入的嵌合肠毒素重组减毒大肠杆菌口服疫苗候选菌株的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
GUAN W K. Research of the recombinant attenuated *Escherichia coli* oral vaccine candidate strain based on the insertion of chimeric enterotoxin gene in the pseudogene [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016.
- [17] 王蒙蒙, 张莉, 李慧, 等. 粪肠球菌生长曲线的测定及其对小鼠脑组织的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(4): 1041-1049.
WANG M M, ZHANG L, LI H, et al. Study on growth curve of *Enterococcus faecalis* and its effect on brain tissue of mice [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(4): 1041-1049.
- [18] 宋健, 林建群, 金燕, 等. 以比生长速率时间曲线为基础的群体生长数学模型 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 836-838.
SONG J, LIN J Q, JIN Y, et al. A new population growth model based on the time dependent changes of the specific growth rate [J]. Microbiology, 2007, 34(5): 836-838.
- [19] FOURNIER B, HOOPER D C. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(14): 3955-3964.
- [20] ZHENG L, YU C X, BAYLES K, et al. Conditional mutation of an essential putative glycoprotease eliminates autolysis in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(7): 2734-2742.
- [21] 方希修, 王冬梅, 唐现文, 等. 携带 EGFP3 质粒的重组减毒鼠伤寒沙门氏菌在小鼠体内的表达 [J]. 免疫学杂志, 2007, 23(2): 180-183.
FANG X X, WANG D M, TANG X W, et al. Expression of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* carrying enhancement green fluorescence protein in mice [J]. Immunological Journal, 2007, 23(2): 180-183.
- [22] 李子尧, 刘雷, 孟蔚, 等. 口腔诊疗用水微生物污染检测方法初探 [C] // 中华预防医学会消毒分会 2014 年学术年会. 合肥: 中华预防医学会消毒分会, 2014: 198-203.
LI Z Y, LIU L, MENG W, et al. Microbiological examination methods for water of dental unit waterlines [C] // Proceedings of the Chinese Society of Preventive Medicine Disinfection Branch Academic Annual Meeting. Hefei, 2014: 198-203.

- [23] 田曙光, 靳小潘, 陈建魁, 等. 以菌蛻作为 DNA 载体构建双重靶向乳腺癌基因疫苗[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(20): 2478-2481.
TIAN S G, JIN X P, CHEN J K, et al. Construction of a dual-targeted breast cancer gene vaccine using bacillus as a DNA vector [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2012, 33(20): 2478-2481.
- [24] 刘芳. DADS 上调 miR-7 靶向 XIAP 抑制人胃癌细胞增殖和侵袭[D]. 衡阳: 南华大学, 2015.
LIU F. Up-regulation of miR-7 targeting for XIAP inhibit proliferation and invasion in human gastric cancer cells induced by diallyl disulfide [D]. Hengyang: Nanhua University, 2015.
- [25] 林镗. Benzonase 酶对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌生物膜的影响[D]. 温州: 温州医科大学, 2014.
LINZ. Effect of Benzonase on forming biofilms by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* [D]. Wenzhou: Wenzhou Medical University, 2014.
- [26] GUSAROV I, STARODUBTSEVA M, WANG Z Q, et al. Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(19): 13140-13147.
- [27] RICHARDSON A R, DUNMAN P M, FANG F C. The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity [J]. Molecular Microbiology, 2006, 61(4): 927-939.
- [28] RICHARDSON A R, LIBBY S J, FANG F C. A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity [J]. Science, 2008, 319(5870): 1672-1676.
- [29] SAPP A M, MOGEN A B, ALMAND E A, et al. Contribution of the *nos-pdt* operon to virulence phenotypes in methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e108868.
- [30] BIRD L E, REN J S, ZHANG J C, et al. Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *Staphylococcus aureus* [J]. Structure, 2002, 10(12): 1687-1696.
- [31] MCCOLLISTER B D, HOFFMAN M, HUSAIN M, et al. Nitric oxide protects bacteria from aminoglycosides by blocking the energy-dependent phases of drug uptake [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(5): 2189-2196.
- [32] ELSON G, DUNN-SIEGRIST I, DAUBEUF B, et al. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria [J]. Blood, 2007, 109(4): 1574-1583.

Phenotypic function of nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus*

WU Congwen^{1,2}, BAO Baolong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to study the function and effect of *staphylococcus aureus* nitric oxide synthase, the full-length sequence of the gene was cloned, and the nitric oxide synthase overexpressing strain was constructed based on the nitric oxide synthase gene-deficient strain. Type validation was conducted to study the effect of NO on bacterial phenotype. The results showed that; the loss of nitric oxide synthase accelerated the rate of autolysis of bacteria, decreased the ability of anti-oxidation killing and the biofilm formation, both the loss and overexpression of nitric oxide synthase can affect the normal growth cycle and rate of bacteria. The different effects of exogenous NO on the biofilms of wild strains, knockout strains and overexpressing strains indicate that *S. aureus* nitric oxide synthase is also involved in the regulation of exogenous NO on biofilms. A series of phenotypic results indicate that the endogenous NO action of *S. aureus* not only blocks the Fenton reaction, enhances catalase activity, but also acts as a signaling molecule to regulate the transcription and expression of bacterial genes.

Key words: *Staphylococcus aureus*; nitric oxide synthase; antioxidant killing; growth rate; autolysis; biofilm