

• 论 著 •

自溶素基因与表皮葡萄球菌生物膜形成相关性研究

张雯雁,叶杨芹,包裕杰,路丹檬,王玉超,范列英

(上海市东方医院/同济大学附属东方医院检验科,上海 200120)

摘要:目的 研究自溶素(atlE)基因与表皮葡萄球菌生物膜形成的相关性。方法 收集 2015 年 6 月至 2016 年 6 月该院临床分离的表皮葡萄球菌 64 株进行研究,用生物膜形成试验检测细菌生物膜,采用聚合酶链反应扩增 atlE 基因,分析 atlE 基因与表皮葡萄球菌生物膜形成的相关性。结果 检出生物膜阳性菌株 24 株,检出率为 37.5%;检出 atlE 基因菌株 31 株,检出率为 48.4%;atlE 基因与表皮葡萄球菌生物膜形成有明显的相关性($P < 0.05$)。结论 表皮葡萄球菌有生物膜形成能力,atlE 基因与表皮葡萄球菌生物膜形成相关。

关键词:表皮葡萄球菌; 生物膜; atlE 基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)22-3134-03

Correlation between atlE gene and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*

ZHANG Wenyan, YE Yangqin, BAO Yujie, LU Danmeng, WANG Yuchao, Fan Lieying

(Department of Clinical Laboratory, Shanghai East Hospital/Affiliated East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between atlE gene and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*.

Methods 64 strains of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* in our hospital from June 2015 to June 2016 were collected. The biofilm formation test was used to detect bacterial biofilm. PCR was used to amplify atlE gene. Then the correlation between the atlE gene with biofilm formation was analyzed. **Results** 24 strains of biofilm positive bacterium were detected, the detection rate was 37.5%; 31 strains of atlE gene was detected, the detection rate was 48.4%; atlE gene was significantly correlated to biofilm formation($P < 0.05$). **Conclusion** *Staphylococcus epidermidis* has the ability to form biofilm; atlE gene has a relation with biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*.

Key words: *Staphylococcus epidermidis*; biofilm; atlE

生物膜又称生物被膜,是物体表面被细菌胞外多聚糖聚合物包裹的结构性细菌群落,定植于机体或人工植入物。表皮葡萄球菌广泛分布于人体皮肤和黏膜表面,是典型的生物被膜菌,它可以通过黏附在一些植入医疗器械表面形成生物被膜,不仅干预机体的免疫应答,同时又造成持续性感染,有迁延不愈的特征^[1-2]。生物膜的形成较为复杂,需要多种因子和基因的共同作用,其中自溶素(atlE)基因及其表达的产物自溶酶蛋白参与了生物膜形成的起始黏附和聚集阶段,atlE 基因可能对表皮葡萄球菌生物膜的形成具有很大的影响^[3]。本研究探讨 atlE 基因与表皮葡萄球菌生物膜形成的相关性,旨在为临床提供参考,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集 2015 年 6 月至 2016 年 6 月本院临床分离的表皮葡萄球菌 64 株进行研究,单瓶血培养阳性菌株视为污染菌株,不纳入试验。表皮葡萄球菌 ATCC12228 为生物膜形成的阴性对照株。

1.2 仪器与试剂 Micro-Scan Walkaway-96 全自动微生物鉴定系统(德国西门子公司)、聚合酶链反应(PCR)热循环仪(日本 Takara 公司)、Tanon-5200 凝胶成像系统(上海天能公司)、BIOTEK-ELX808U 酶标仪(美国伯乐仪器有限公司)、血琼脂平板(北京赛默飞世尔有限公司)。PCR 反应所需试剂及引物购自 Invitrogen 公司,LB 肉汤、结晶紫、Bouin 固定液、琼脂糖均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 表皮葡萄球菌生物膜形成方法 参照文献[4]将表皮葡萄球菌接种于新鲜配制的 LB 液体培养基中,35 ℃ 培养过夜,按 1:200 比例稀释新鲜 LB 肉汤,取 200 μL 加入到无菌的 96 孔平底细胞培养板中,每孔分别接种 4 孔。每一细胞培养板中设置空白对照(同体积的无菌 LB 肉汤)4 孔,阴性对照菌株(SE ATCC 12228)4 孔。35 ℃ 培养 20 h,吸干每孔菌液,用磷酸缓冲盐溶液(pH 7.2)洗板 3 次,将未黏附的细菌洗去后晾干;然后在每孔中加入 200 μL Bouin 氏固定液固定 1 h,冲洗晾干;再次在每孔中加入 200 μL 结晶紫染色 10 min,去离子水冲洗未黏附的细菌后晾干;最后在每孔中加入 200 μL 无水酒精,轻微振荡。在酶标仪下读取每孔在 570 nm 处的吸光度值,以阴性对照孔为参考,大于阴性对照孔的平均吸光度值加 3 倍标准差则认为是阳性。

1.3.2 表皮葡萄球菌基因组 DNA 提取方法 在血琼脂平板上接种各临床分离菌株及质控菌株,放入 35 ℃ 普通培养箱培养 24 h,接种环取适量菌落加入 300 μL 生理盐水中,充分搅拌混匀,12 000 r/min 离心 5 min,弃去上清;在沉淀中加入 300 μL 无菌水,充分颠倒混匀,煮沸 15 min,12 000 r/min 离心 5 min,留取上清。上清中即包含表皮葡萄球菌的基因组 DNA,即用于 PCR 扩增的模板 DNA,4 ℃ 短期保存备用。

1.3.3 PCR 基因扩增方法 用 1×TAE 缓冲液制作 1% 琼脂糖凝胶,取上样缓冲液 2 μL 与已扩增 DNA 10 μL 混匀,取 10 μL 于 110 V 电压下电泳约 30 min,然后用 Tanon-5200 观察是否有条带,并拍照。PCR 扩增体系:2×Taq PCR MasterMix

12.5 μL, 上游引物(5'-CAA CTG CTC AAC CGA GAA CA-3')1 μL, 下游引物(5'-TTT GTA GAT GTT GTG CCC CA-3')1 μL, DNA 模板 Template 5 μL, 无菌水补至 25 μL。PCR 反应扩增条件: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 5 min。

1.4 统计学处理 利用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, atlE 基因与表皮葡萄球菌生物膜形成的相关检验采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 生物膜形成结果 生物膜形成阳性菌株数为 24, 占 37.5%。见图 1。

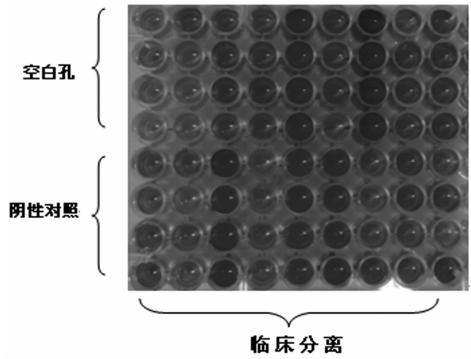
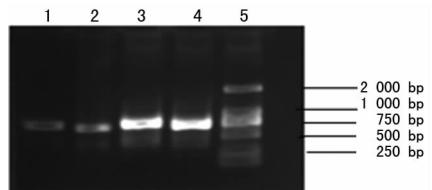


图 1 生物膜形成试验结果图

2.2 PCR 扩增与测序结果 临床分离菌株中有 31 株检出 atlE 基因, 检出率为 48.4%, 其中特异性片段长度在 500~750 bp 之间。将 PCR 扩增得到特异性片段纯化后测序, 得到片段长度为 627 bp, 与 blast 比对, 确定为表皮葡萄球菌 atlE 基因。见图 2。



注: 1~4 为表皮葡萄球菌临床分离株, 5 为 2 000 bp 标记物。

图 2 PCR 扩增结果

2.3 atlE 基因与表皮葡萄球菌生物膜形成关系比较 见表 1。

表 1 atlE 基因与表皮葡萄球菌生物膜形成关系比较(n)

组别	生物膜阳性	生物膜阴性	χ^2	P
atlE 阳性	16	15	5.019	0.022
atlE 阴性	8	25		

3 讨 论

随着导管等一些人体植人性医疗器械使用的增加, 表皮葡萄球菌感染所占比率逐年上升。抗菌药物治疗此类感染的效果较差, 除非及时移除这些生物材料, 否则感染往往迁延难愈^[5], 其主要原因是表皮葡萄球菌在这些组织黏膜及材料表面形成生物膜。生物膜是由细菌在其分泌的黏液内形成的结构, 是细菌团块与细胞外基质的复合体, 可以保护膜内细菌免于抗菌药物和人体免疫机制的杀伤作用。在感染部位形成生物膜的细菌还可以释放浮游细菌到身体的各个部位, 造成慢性持续性疾病^[6]。

细菌生物膜的形成可分为 4 个阶段: 起始黏附、细菌间的吸附与增殖、生物被膜成熟和成熟生物膜细菌脱落^[7-8]。生物膜的形成是一个动态过程, 结构上存在不均质性。不均质性是细菌生物膜的另一个重要特性, 也与细菌的抗性有关。atlE 是一个相对分子质量大约为 148×10^3 的蛋白, 是细胞自身存在并能破坏细胞的水解酶之一, 其由两个溶菌活性区 (60×10^3 酸胺酶区和 52×10^3 氨基葡萄糖苷酶区) 组成, 能参与细胞分裂, 溶解细胞生物被膜。有研究表明表皮葡萄球菌毒力进化与生物膜的形成有关, 表型取决于主体免疫反应表面的定植能力和调控因子。因此, 在起始黏附阶段时, atlE 蛋白可以促使细菌黏附于外来材料表面并与之结合, 与生物相关感染有影响^[9], 其还可以非共价键锚定到细胞壁上发挥自溶素及黏附素的功能^[10]。国内外文献报道 atlE 基因的检出率为 58%~100%^[11-13]。本研究结果显示, 64 株表皮葡萄球菌中有 31 株检出 atlE 基因 (48.4%), atlE 基因检出率低于文献报道, 其差异可能与引物设计、DNA 提取质量及 atlE 基因表达受环境影响等因素有关^[14]。同时, 本研究发现 atlE 基因与表皮葡萄球菌生物膜形成有明显相关性。

综上所述, 表皮葡萄球菌有生物膜形成能力, 且 atlE 基因与表皮葡萄球菌生物膜形成相关。

参 考 文 献

- [1] Li M, Wang X, Gao Q, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China [J]. *J Med Microbiol*, 2009, 58(Pt 4): 456-461.
- [2] 陈颖, 雷玉洁, 黄云超, 等. 聚集相关蛋白基因与转化生长因子 $\beta 1$ 对肺癌相关生物材料表皮葡萄球菌生物膜形成的影响 [J]. 中国肺癌杂志, 2014 (4): 308-314.
- [3] Vadyvaloo V, Otto M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices [J]. *Int J Artif Organs*, 2005, 28(11): 1069-1078.
- [4] Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices [J]. *J Clin Microbiol*, 1985, 22(6): 996-1006.
- [5] 于树云, 宋诗铎. 表皮葡萄球菌临床株生物被膜形成及其 icd 基因的分析 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 29(4): 302-306.
- [6] 叶杨芹, 包裕杰, 马珂, 等. 表皮葡萄球菌生物膜形成与细菌耐药性的相关性分析 [J]. 国际检验杂志, 2016, 37(4): 618-620.
- [7] 叶联华, 黄云超, 杨达宽, 等. 聚氯乙烯材料表面细菌生物膜结构观察 [J]. 生物医学工程与临床, 2007, 11(4): 1009-1090.
- [8] Arciola CR, Campoccia D, Ehrlich GD, et al. Biofilm-based implant infections in orthopaedics [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 830(10): 29-46.
- [9] Mack D. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation [J]. *J Hosp Infect*, 1999, 43(Suppl): S113-S125.
- [10] Bowden MG, Visai L, Longshaw CM, et al. Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* (下转第 3138 页)

型扩增曲线,此浓度为 mip-3 最低检测限。

2.5 重复性试验结果 mip-3 引物在 10 次重复检测中几乎同时出峰,多条扩增曲线重叠,可见稳定性良好。

3 讨 论

嗜肺军团菌属于胞内寄生菌,培养鉴定周期长,对大多数抗菌药物耐药,人群普遍易感染,是医院感染的重要病原菌之一,其临床表现可为轻重不等的感染症状。因此探讨快速检测嗜肺军团菌对临床诊断和治疗具有重要意义。近年来 LAMP 技术被广泛地运用于分子诊断技术领域中,其特点是:设备简单、特异性强、灵敏度高、操作简便、反应快等^[5]。目前国内学者研究的 LAMP 检测方法主要有肉眼观察法和添加荧光染料法。肉眼观察法主要通过肉眼观察反应浊度的变化,但存在弱阳性结果难以判断的缺点;而添加荧光染料法的主要缺点是反应结束后开盖会导致产物的气溶胶污染^[7]。

本研究基于 LAMP 的基本原理,利用 Bst DNA 聚合酶和针对靶序列设计的两对特殊的内、外引物,特异性识别靶序列上的 6 个独立区域,启动循环链置换反应。在恒温实时荧光反应中,内引物杂交在目标 DNA 区,启动互补链合成,再通过外引物在同一链上互补序列。这样周而复始形成有很多环的花椰菜结构的茎-环 DNA 混合物,从而实现对目的基因快速检测^[7]。本研究建立的 LAMP 方法的主要优点是:(1)本研究根据嗜肺军团菌 mip 毒力基因靶序列上的 6 个独立区域设计设计了 6 条引物,能特异性识别嗜肺军团菌 mip 基因,加入环引物缩短反应时间^[8],在 63 °C 的 LAMP 反应体系中恒温反应 10 min 左右便可以出峰,与传统 PCR 方法相比反应时间大大缩短;(2)特异性引物能找出标本中相对应的基因序列进行识别扩增,且在反应结束时可根据有或无“S”型扩增曲线则判定为阳性或阴性,试验具有高度的特异性和较强的直观性;(3)试验选取的嗜肺军团菌和 8 种其他病原菌的 DNA 在 LAMP 体系中同步扩增,仅有嗜肺军团菌出现阳性结果,试验具有良好的特异性;(4)LAMP 检测限可达 100 fg/μL,试验具有较高灵敏性;(5)稳定性试验中 10 条反应曲线几乎同时出峰且反应曲线重叠,试验具有良好的稳定性;(6)加入新型荧光染料 SYTO-9 进行实时荧光动态监测能直观反映整个扩增过程的动态变化^[9];(7)LAMP 检测方法不需要预先进行双链 DNA 的变性,不需要热循环仪器^[10]。总之,本研究建立的 LAMP 检测方法创新性强,引物设计独特,出峰时间早,反应时间缩短,可直观判断,无需开盖,避免了在扩增后开盖导致的气溶胶污染。本研究不足之处主要是:(1)DNA 提取过程仍需特别注意污染,需在生物安全柜中操作,使用滤芯吸嘴等避免污染;(2)本试验只是定性检测,下一步将设计标准曲线尝试用于定量检测;(3)用于试验的标本量比较少,下一步需要对临床标本进行验证。

(上接第 3135 页)

- a collagen binding adhesin? [J]. J Biol Chem, 2002, 277(45):43017-43023.
- [11] 韩乾国,余汝佳,高燕渝,等.临床分离表皮葡萄球菌生物膜相关遗传背景与表现型关系研究[J].四川医学,2006,27(5):453-455.
- [12] 李燕,李冬冬,陶传敏,等.表皮葡萄球菌生物膜形成及相关基因的检测及评价[J].中华医院感染学杂志,2010,20(4):473-476.
- [13] Rohde H, Kalitzky M, Kroger N, et al. Detection of viru-

综上所述,LAMP 方法具有反应速度快、特异性强、灵敏度高、方便快捷、能够直观地观察试验结果等优点,可为检测嗜肺军团菌提供一种新的快速检测方法,有望成为临床的常规检测方法。

参考文献

- [1] 杨俊发,柴晓宇,许飞. LAMP 技术在肺部非典型感染病原体检测中的应用[J]. 重庆医学,2013,42(18):2122-2124.
- [2] 吕沁风,郑伟,罗鹏,等.嗜肺军团菌环介导等温扩增检测法的建立[J].浙江大学学报(医学版),2010,39(3):305-310.
- [3] 张明哲,陈曦,徐俊锋,等.环介导等温扩增技术在转基因水稻 Bt63 检测中的应用[J].生物技术通报,2014,30(2):69-74.
- [4] 李红梅,江晓,刘助红,等.白斑综合症病毒实时荧光 LAMP 检测方法的建立及应用[J].水生生物学报,2014,39(1):142-148.
- [5] 李琳,周蓉,李冰,等.环介导恒温核酸扩增法在病原微生物快速检测领域的应用[J].现代食品科技,2014,30(6):301-307.
- [6] 刘孝波,蒋栋能,项贵明,等. LAMP 结合示差脉冲伏安法快速检测肺炎克雷伯菌的方法建立及临床应用[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(12):1539-1541.
- [7] 郭旭光,黄美淦,刘庆锋,等.实时荧光环介导恒温扩增技术检测嗜麦芽窄食单胞菌方法的建立[J].广东医学,2016,37(24):3663-3666.
- [8] 刘琳琳,蒋栋能,蒲晓允.利用环介导恒温扩增法快速检测伤寒杆菌[J].国际检验医学杂志,2013,34(5):534-535.
- [9] 徐前明,袁恒青,赵长城,等.岗地弓形虫 529 bp 重复序列环介导等温扩增检测方法的建立[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2016,34(5):444-447.
- [10] 李启明,马学军,高寒春,等.逆转录环介导等温核酸扩增技术(RT-LAMP)在 H5N1 禽流感病毒基因检测中的应用[J].病毒学报,2008,24(3):178-184.
- [11] 戴婷婷,陆晨晨,郑小波.环介导等温扩增技术在病原物检测上的应用研究进展[J].南京农业大学学报,2015,38(5):695-703.

(收稿日期:2017-04-12 修回日期:2017-07-01)

lence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12):5614-5619.

- [14] 徐金莲,孙自庸,简翠,等.临床分离表皮葡萄球菌相关基因与生物膜表型的关系[J].国际检验杂志,2014,35(11):1387-1389.

(收稿日期:2017-03-26 修回日期:2017-07-15)