

分类号：  
学 号：20222013037

密 级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### *clfB* 基因调控金黄色葡萄球菌生物被膜形成及 对噬菌体敏感性的研究

学 位 申 请 人	周 齐
指 导 教 师	屈勇刚 教授 李彦芳 高级兽医师
申请学位门类级别	农学硕士
学 科、专 业 名 称	兽 医 学
研 究 方 向	预防兽医学
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子  
2025 年 6 月

分类号：  
学号：20222013037

密级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### *clfB* 基因调控金黄色葡萄球菌生物被膜形成及对噬菌体敏感性的研究

学位申请人	周齐
指导教师	屈勇刚 教授 李彦芳 高级兽医师
申请学位门类级别	农学硕士
学科、专业名称	兽医学
研究方向	预防兽医学
所在学院	动物科技学院

中国·新疆·石河子  
2025年6月

**Regulation of biofilm formation and phage sensitivity by Clumping  
factor B in *Staphylococcus aureus***

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Agriculture**

**By**

**Zhou Qi**

**(Veterinary science)**

Dissertation Supervisor: Prof. Qu Yong-gang

June, 2025

Shihezi, Xinjiang, China

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：

周齐

时间：2025年5月25日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：

周齐

时间：2025年5月25日

导师签名：

周刚

时间：2025年5月25日

## 摘要

**目的:**金黄色葡萄球菌是一种临床上重要的病原体。由于抗生素的滥用,越来越多的耐药菌相继出现,给临床上金葡菌感染的防治带来了巨大挑战。生物被膜的形成显著提高细菌耐药性与细菌免疫逃避能力。噬菌体作为细菌天敌,在防治和去除致病性细菌生物被膜方面有巨大潜力。但目前仍缺乏其作用机理方面的研究。前期通过筛选 P51 感染后 J57 差异表达基因,得到一系列生物被膜形成相关的差异基因,本研究以其中的 *clfB* 为目的基因,构建基因缺失株和回补株,通过对比三株菌在生物学特性、生物被膜形成能力及噬菌体敏感性等表型上的差异,并利用 RNA-seq 技术在转录水平上分析差异表达基因,为进一步研究金黄色葡萄球菌的致病机理及防控提供理论依据。

**方法:** (1) 以金葡菌 J57 为研究对象,采用同源重组技术构建 *clfB* 基因缺失株  $\Delta$ *clfB* 和回补株 C $\Delta$ *clfB*。(2) 通过测定 J57、 $\Delta$ *clfB* 和 C $\Delta$ *clfB* 的生长曲线、形态结构、溶血性、自溶率、生物被膜形成能力和药物敏感性,并对各菌株形成的生物被膜组分进行定量分析,探究 *clfB* 基因缺失对生物学特性的影响。(3) 通过测定噬菌体 P51 对 J57、 $\Delta$ *clfB* 和 C $\Delta$ *clfB* 的成斑效率、体外裂解活性、吸附性、生物被膜抑制作用及 ClfB 抗体影响噬菌体对菌株吸附性试验探究 *clfB* 基因缺失对噬菌体敏感性的影响。(4) 将 J57 和  $\Delta$ *clfB* 进行转录组学分析,探究 *clfB* 基因缺失后 J57 菌株的差异基因表达及通路富集情况。

**结果:** (1) 成功构建 *clfB* 基因缺失株  $\Delta$ *clfB* 和回补株 C $\Delta$ *clfB*。(2) 通过对 J57、 $\Delta$ *clfB* 和 C $\Delta$ *clfB* 的相关生物学特性进行测定并分析,结果表明,*clfB* 基因缺失会导致其溶血能力和自溶率显著下降,对氯霉素、庆大霉素和卡那霉素的敏感性增强,对利奈唑胺的敏感性降低,生物被膜的能力显著降低,生物被膜中胞外 DNA 和蛋白质含量显著下降,可溶性多糖含量显著升高;*clfB* 基因不影响金黄色葡萄球菌的生长和微观形态结构。(3) 通过对 J57 株、 $\Delta$ *clfB* 及 C $\Delta$ *clfB* 噬菌体敏感性进行测定并分析,结果表明,敲除金黄色葡萄球菌 J57 的 *clfB* 基因会导致其噬菌体敏感性和成斑效率显著下降,P51 对其吸附率、体外裂解能力和生物被膜抑制能力显著下降,ClfB 抗体能够部分抑制噬菌体 P51 对金葡菌 J57 的吸附。因此,*clfB* 基因缺失降低金黄色葡萄球菌对噬菌体的敏感性。(4) 通过对转录组数据进行比较分析,共筛选出 436 个差异基因,其中 206 个上调基因,230 个下调基因。通过 KEGG 富集分析发现 *clfB* 基因缺失后,主要影响核糖体翻译、丙氨酸天冬氨酸和谷氨酸代谢和微生物在不同环境中的代谢。*clfB* 基因缺失可显著下调 *sarA*、*atl*、*hly*、*katA* 等基因表达水平,进而介导金黄色葡萄球菌溶血活性降低、自溶速率下降以及生物被膜形成能力减弱;其次该基因缺失通过抑制 agr 群体感应系统的信号传导通路,进而激活 CRISPR-Cas 防御系统,最终导致菌株对噬菌体的敏感性显著降低。

**结论:** *clfB* 基因与金黄色葡萄球菌的自溶、溶血能力、生物被膜形成能力密切相关,影响细菌对部分抗生素的敏感性,参与调控噬菌体-细菌之间的相互作用。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌; *clfB*; 生物被膜; 噬菌体敏感性; 转录组学

## Abstract

**Object:** *Staphylococcus aureus* (SA) is a clinically significant pathogen. The widespread misuse of antibiotics has led to the emergence of multidrug-resistant strains, posing substantial challenges in the prevention and treatment of SA infections. Biofilm formation significantly enhances bacterial antibiotic resistance and immune evasion. As natural predators of bacteria, bacteriophages exhibit great potential in controlling and eradicating pathogenic bacterial biofilms. However, the underlying mechanisms remain poorly understood. Our preliminary screening identified differentially expressed genes associated with biofilm formation in SA strain J57 after P51 phage infection, among which *clfB* was selected as the target gene. In this study, we constructed gene deletion and backfill strains with one of the *clfB* as the target gene. By comparing the phenotypic differences of the three strains in biological characteristics, biofilm formation ability and phage susceptibility, and analyzing the differential genes at the transcriptional level by using the RNA-seq technology, we can provide theoretical bases for the further research on the pathogenicity mechanism of *Staphylococcus aureus* as well as the prevention and control of *S. aureus*.

**Methods:** (1) The *clfB* gene knockout strain ( $\Delta\textit{clfB}$ ) and complemented strain ( $C\Delta\textit{clfB}$ ) were constructed using homologous recombination in SA strain J57. (2) Biological characteristics of J57,  $\Delta\textit{clfB}$ , and  $C\Delta\textit{clfB}$  were evaluated by analyzing growth curves, morphology, hemolytic activity, autolysis rate, biofilm formation capacity, drug susceptibility, and quantitative analysis of biofilm components. (3) Phage P51 susceptibility was assessed through plaque-forming efficiency, in vitro lytic activity, adsorption rate, biofilm inhibition assays, and ClfB antibody-mediated adsorption interference. (4) Transcriptomic profiling of J57 and  $\Delta\textit{clfB}$  was performed to identify differentially expressed genes and enriched pathways.

**Results:** (1) Successfully constructed the *clfB* gene deletion strain  $\Delta\textit{clfB}$  and the complemented strain  $C\Delta\textit{clfB}$ . (2) Through the measurement and analysis of the relevant biological characteristics of J57,  $\Delta\textit{clfB}$ , and  $C\Delta\textit{clfB}$ , the results indicate that the deletion of the *clfB* gene significantly reduces its hemolytic ability and autolysis rate, enhances sensitivity to chloramphenicol, gentamicin, and kanamycin, decreases sensitivity to linezolid, significantly reduces the ability to form biofilms, significantly decreases the content of extracellular DNA and proteins in biofilms, and significantly increases the content of soluble polysaccharides; the *clfB* gene does not affect the growth and microscopic morphology of *Staphylococcus aureus*. (3) By measuring and analyzing the phage sensitivity of strain J57,  $\Delta\textit{clfB}$  and  $C\Delta\textit{clfB}$ , the results showed that knockdown of the *clfB* gene of *S. aureus* J57 led to a significant decrease in its phage sensitivity and spotting efficiency, and a significant decrease in the adsorption rate, in vitro cleavage ability, and biopermeable inhibition ability of P51, and that the ClfB antibody was able to be able to partially inhibit the adsorption of phage P51 to *S. aureus* J57. ClfB antibody was able to partially inhibit the adsorption of phage P51 on J57. Therefore, *clfB* gene deletion reduced the sensitivity of *S. aureus* to phage. (4) Through comparative analysis of transcriptome data, a total of 436 differentially expressed genes were screened, including 206 upregulated genes and 230 downregulated genes. KEGG enrichment analysis revealed that the deletion of the *clfB* gene mainly affects ribosomal translation, alanine, aspartate, and glutamate metabolism, and microbial metabolism in different

environments. *clfB* gene deletion significantly down-regulates the expression levels of *sarA*, *atl*, *hly*, *katA*, and other genes, which in turn mediates the reduction of *S. aureus* hemolytic activity, autolysis rate, and the ability of biofilm formation; and secondly, the deletion of this gene inhibits the signaling pathway of the *agr* group sensing system, which in turn activates the CRISPR-Cas defense system, and ultimately leads to a significant reduction in the strain's susceptibility to Phage sensitivity.

**Conclusion:** The *clfB* gene is closely related to autolysis, hemolytic capacity, and biofilm formation of *Staphylococcus aureus*, affects bacterial susceptibility to some antibiotics, and is involved in regulating phage-bacteria interactions.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; *clfB*; biofilm; phage susceptibility; transcriptomics

# 目录

摘要.....	I
<b>Abstract</b> .....	II
主要缩略词.....	VII
第 1 章 绪论.....	1
1.1 金黄色葡萄球菌研究进展.....	1
1.1.1 金黄色葡萄球菌的概述.....	1
1.1.2 金黄色葡萄球菌生物被膜的发育.....	2
1.1.3 金黄色葡萄球菌生物膜形成相关调控机制.....	3
1.2 噬菌体防控细菌生物膜的研究.....	6
1.3 转录组学在抗菌机理研究中的应用价值.....	6
1.4 <i>clfB</i> 基因的功能与潜在调控机制.....	7
1.5 研究的目的与意义.....	7
第 2 章 金黄色葡萄球菌 <i>clfB</i> 基因缺失株及回补株的构建.....	9
2.1 材料与方法.....	9
2.1.1 菌株和质粒.....	9
2.1.2 主要试剂与仪器.....	10
2.1.3 主要试剂配制.....	10
2.1.4 引物设计与合成.....	11
2.1.5 上游臂与下游臂的扩增与融合.....	11
2.1.6 重组质粒 pMD19-T- $\Delta$ <i>clfB</i> 的构建与鉴定.....	13
2.1.7 敲除质粒 pBT2- $\Delta$ <i>clfB</i> 的构建及鉴定.....	13
2.1.8 金葡菌 RN4220 感受态细胞制备.....	14
2.1.9 pBT2- $\Delta$ <i>clfB</i> 转化金葡菌 RN4220 修饰.....	15
2.1.10 <i>clfB</i> 基因缺失株的筛选与鉴定.....	15
2.1.11 回补质粒的构建及鉴定.....	16
2.1.12 基因回补株 C $\Delta$ <i>clfB</i> 的构建与鉴定.....	16
2.2 结果与分析.....	17
2.2.1 上下游同源臂的扩增与融合.....	17
2.2.2 融合片段双酶切鉴定.....	17
2.2.3 重组质粒 pBT2- $\Delta$ <i>clfB</i> 双酶切鉴定.....	18
2.2.4 敲除质粒 pBT2- $\Delta$ <i>clfB</i> 的修饰.....	19

2.2.5	敲除株 $\Delta clfB$ 的筛选与鉴定 .....	19
2.2.6	回补株 $C\Delta clfB$ 的构建 .....	21
2.3	讨论 .....	21
2.4	小结 .....	22
第 3 章	金黄色葡萄球菌 J57、 $\Delta clfB$ 和 $C\Delta clfB$ 的相关生物学特性研究 .....	23
3.1	材料与方法 .....	23
3.1.1	主要试剂与仪器 .....	23
3.1.2	主要试剂配制 .....	24
3.1.3	透射电镜观察 .....	24
3.1.4	生长曲线的绘制 .....	24
3.1.5	溶血性分析 .....	24
3.1.6	溶菌试验 .....	25
3.1.7	生物被膜 (BF) 形成能力测定 .....	25
3.1.8	生物被膜各组分含量的测定 .....	25
3.1.9	耐药性试验 .....	26
3.1.10	数据的统计与分析 .....	26
3.2	结果与分析 .....	26
3.2.1	形态观察 .....	26
3.2.2	生长曲线测定 .....	27
3.2.3	溶血性分析 .....	27
3.2.4	Triton X-100 诱导自溶试验结果 .....	28
3.2.5	各菌株生物被膜形成能力的测定结果 .....	28
3.2.6	生物被膜各组分含量的测定结果 .....	29
3.2.7	耐药性试验结果 .....	30
3.3	讨论 .....	30
3.4	小结 .....	32
第 4 章	$\Delta clfB$ 缺失株对噬菌体敏感性的研究 .....	33
4.1	材料与方法 .....	33
4.1.1	主要试剂与仪器 .....	33
4.1.2	噬菌体的扩增与效价测定 .....	34
4.1.3	噬菌体敏感性及其成斑效率分析 .....	34
4.1.4	噬菌体对缺失株的吸附性测定 .....	34
4.1.5	噬菌体对缺失株裂解活性测定 .....	35
4.1.6	$C1fB$ 抗体影响噬菌体对菌株吸附性研究 .....	35

4.1.7 噬菌体对生物被膜抑制作用 .....	35
4.1.8 数据的统计与分析 .....	35
4.2 结果与分析 .....	36
4.2.1 缺失株 $\Delta clfB$ 对噬菌体敏感性和成斑效率测定结果 .....	36
4.2.2 噬菌体对缺失株 $\Delta clfB$ 吸附能力测定结果 .....	36
4.2.3 噬菌体对缺失株 $\Delta clfB$ 体外裂解活性测定结果 .....	37
4.2.4 ClfB 抗体影响噬菌体对菌株吸附性研究结果 .....	37
4.2.5 噬菌体对缺失株 $\Delta clfB$ 生物被膜抑制作用 .....	38
4.3 讨论 .....	38
4.4 小结 .....	39
第 5 章 缺失株 $\Delta clfB$ 的转录组学分析 .....	40
5.1 材料与方法 .....	40
5.1.1 主要仪器与试剂 .....	40
5.1.2 菌株的复苏与活化 .....	40
5.1.3 测序样品制备 .....	40
5.1.4 转录组测序文库的构建和测序 .....	41
5.1.5 测序数据的处理与分析 .....	41
5.2 结果与分析 .....	42
5.2.1 测序数据质控和比对分析 .....	42
5.2.2 表达差异性分析 .....	44
5.2.3 差异表达基因功能富集分析 .....	44
5.3 讨论 .....	46
5.4 小结 .....	47
全文总结 .....	48
创新点 .....	49
参考文献 .....	50

## 主要缩略词

### Main Abbreviations

英文缩写	英文全称	中文名称
min	minute	分钟
mL	milliliter	毫升
pH	hydrogen ion concentration	酸碱度
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PFU	Plaque-forming unit	噬菌体形成单位
CFU	Colony-forming Unit	菌落形成单位
TEM	Transmission electron microscope	透射电子显微镜
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
OD	Optical Density	光密度
bp	Base pair	碱基对
r/min	Rotation per minute	每分钟转速
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
BHI	Brain Heart Infusion	脑心浸液培养基
°C	centigrade	摄氏度
DNA	Dienthyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
K-B	Kirby-Bauer	纸片琼脂扩散法
PBS	phosphate buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	临床实验室标准化协会
MRSA	Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	国际病毒分类委员会

## 第 1 章 绪论

### 1.1 金黄色葡萄球菌研究进展

#### 1.1.1 金黄色葡萄球菌的概述

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是厚壁菌门 (Firmicutes) 的革兰氏阳性球菌, 具有非运动性, 并且具有凝固酶阳性特征。尽管该细菌属共有 52 个种类, 其中有 28 个亚种, 但它仍被认定为目前在临床上应用最广泛的细菌。在 20%~40% 的普通人群中, 在鼻黏膜的人类共生微生物群中发现了金黄色葡萄球菌<sup>[1]</sup>。金黄色葡萄球菌是一种临床上重要的病原体, 是一种机会性病原体, 在体表屏障功能受损的情况下 (如慢性皮肤病变、创伤性损伤或外科手术), 机会致病菌金黄色葡萄球菌可通过破损部位侵袭至深层组织或进入血液循环系统, 从而引发局部或全身性感染。研究显示, 存在静脉置管等侵入性装置的患者群体及免疫功能低下个体, 其感染风险较普通人群显著升高。该致病菌的侵袭机制与其表面黏附因子和免疫逃逸特性密切相关, 尤其在医疗相关感染中具有重要临床意义。

金黄色葡萄球菌作为临床重要病原菌, 其多重耐药特性已成为医疗机构相关感染和社区获得性感染的重要诱因。值得注意的是, 近年来社区获得性耐甲氧西林菌株 (CA-MRSA) 的检出率呈现持续增长趋势, 这一现象与细菌的毒力因子变异及生物膜形成能力增强存在显著相关性。流行病学调查数据表明, 该菌株的传播模式已突破传统医院感染防控体系, 对公共卫生安全构成新的挑战<sup>[2][3]</sup>。中国细菌耐药监测网 (CHINET) 数据显示金黄色葡萄球菌的检出率位于临床主要分离菌的第 3 位, 占总样本的 9.08%, 其中 MRSA 检出率高达 29.1%。金黄色葡萄球菌的生物被膜形成能力与其耐药表型密切相关<sup>[4]</sup>。在临床分离株中具备生物被膜合成能力的菌株, 其多重耐药发生率高达 86.7%<sup>[5]</sup>。进一步研究发现, 成熟生物被膜在持续性感染过程中发挥关键致病作用, 其三维结构不仅通过物理屏障阻碍抗生素渗透, 更能诱导菌体进入代谢抑制状态, 从而显著增强微生物群体对宿主免疫清除和抗菌治疗的抵抗能力。这种生物被膜介导的耐药机制在慢性骨髓炎、人工装置相关感染等难治性病例中尤为突出, 为临床抗感染治疗策略的优化提供了重要理论依据。研究证实, 生物膜内处于休眠状态的病原体可重新激活并迁移至次级感染部位, 导致感染范围扩大及病情加重<sup>[6]</sup>。

金黄色葡萄球菌作为奶牛乳房炎的主要致病菌, 其致病过程包括对乳腺上皮细胞的侵袭定植与组织重构。该病原体引发的慢性乳房炎可造成泌乳组织结构不可逆损伤, 病

理学观察显示受损腺体组织逐渐被纤维化基质替代, 最终导致奶牛泌乳功能衰退及乳品产量下降<sup>[7]</sup>。养殖环节中抗菌药物的不规范使用不仅增加乳制品中药物残留风险, 更严峻的是, 感染乳区内持续存在的活菌及其代谢毒素可通过原料乳进入食品加工链。流行病学数据显示, 此类污染事件与葡萄球菌肠毒素引发的食物中毒存在显著相关性, 已成为威胁食品安全的重要公共卫生问题。

### 1.1.2 金黄色葡萄球菌生物被膜的发育

17 世纪, 荷兰商人 Leeuwenhoek 通过他发明的显微镜观察牙菌斑样本时首次发现了细菌群, 但直到 1978 年 Coslerlon 等人提出细菌生物被膜相关理论, 才使得这一概念得以普及<sup>[8]</sup>。生物被膜是细菌在压力环境下粘附于物体表面形成的由细菌及其胞外分泌物组成的复杂三维聚合物, 从而保护其能够在恶劣的条件下生存<sup>错误!未找到引用源。</sup>。金黄色葡萄球菌生物膜的形成过程呈现多阶段动态调控机制, 其完整生命周期可分为三个关键时期: 表面定植期、发育成熟期和生物膜解聚期。在初始定植阶段, 微生物通过表面黏附素与宿主表面发生特异性相互作用; 进入结构强化期后, 通过胞外基质的合成与组合形成三维立体结构; 最终在群体感应系统调控下, 实现生物膜结构的程序性崩解及浮游态菌体的释放, 从而完成感染扩散的生物学循环<sup>[10]</sup>。

金黄色葡萄球菌的生物被膜形成始于识别粘附过程, 该过程涉及病原体对生物基质或无机材料表面的特异性锚定。研究显示, 该病原体在医疗器材等无机基质表面的附着过程呈现动态可逆特征, 其结合强度由菌体表面疏水特性与基质表面能共同决定。通过自溶素与磷壁酸构成的分子复合体, 协同调控表面电荷分布及疏水基团暴露水平, 进而优化界面结合效能<sup>[11]</sup>。群体感应系统在此过程中通过调控黏附相关基因表达, 实现从可逆物理吸附向稳定生物膜结构的转变。非生物表面的粘附常发生在医疗器械等表面, 不仅影响器械本身性能, 治疗不及时会导致全身感染, 严重者引起死亡<sup>[12]</sup>。细菌通过特异性粘附附着在生物表面, 该过程依赖于细胞壁锚定蛋白(CWA)与宿主细胞外基质(ECM)的共价结合, 其中最典型的组被称为微生物表面的识别粘附基质分子 MSCRAMM<sup>[13]</sup>。一些 MSCRAMM 通过促进对宿主基质成分的初始附着来促进生物被膜的形成, 其中包括丝氨酸天冬氨酸重复家族蛋白(Serine-aspartate repeat-containing protein, SdrC、SdrD 和 SdrE)、纤维连接蛋白结合蛋白 FnBPA 和 FnBPB、聚集因子 A(Clumping factor A, ClfA) 和聚集因子 B(Clumping factor B, ClfB) 和骨唾液酸蛋白结合蛋白(Bone sialoprotein-binding protein, Bbp)<sup>[14][15]</sup>。

生物被膜的发育成熟依赖菌体聚集与胞外基质重构的动态平衡<sup>[16]</sup>。当金黄色葡萄球菌完成表面定植后, 首先开始增殖形成微菌落, 通过细菌分泌或者菌体死亡裂解形成的胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)与细菌相互作用促进生物被膜不断发育<sup>[17]</sup>。研究发现其生物被膜形成存在两种分子机制: ica 操纵子调控型途径通过合成

多糖细胞间黏附素 (PIA) 介导菌体间粘附<sup>[18]</sup>; 而 *ica* 非依赖性途径则依赖多种表面蛋白的协同作用, 包括纤维蛋白原结合蛋白 (FnbpA/B) 介导宿主基质锚定, 积聚相关蛋白 (Aap) 形成链状聚合结构, 以及 SasC/SasG、Embp、ClfA/B 等表面分子通过蛋白-蛋白相互作用介导细胞间识别<sup>[19]</sup>。值得注意的是, 非 PIA 依赖型生物被膜的形成机制具有更高的环境适应性, 可在宿主免疫压力下通过动态调控表面蛋白表达实现耐药表型转换。研究显示, 胞外分泌型蛋白水解酶通过调控胞外聚合物中蛋白质组分的动态平衡, 在以蛋白基质为基础的生物膜三维结构中起核心调控作用<sup>[20]</sup>。研究证实, 革兰氏阳性菌 (如金黄色葡萄球菌) 的细胞壁磷壁酸通过静电相互作用调控表面电荷分布, 介导胞外聚合物基质的结构变化, 在生物膜形成中发挥关键作用。由细菌死亡裂解释放的胞外 DNA (eDNA) 在 *ica* 非依赖金葡菌生物被膜形成的早期粘附和成熟阶段发挥重要作用, 其水平受耐热核酸酶调控<sup>[21]</sup>。在生物被膜发育成熟过程中, 深层细菌通过生物被膜中的结构通道获取营养物质, 这些通道的形成依赖于一些因子对生物被膜一定程度的降解, 如蛋白酶、酚可溶性蛋白 (PSMs) 和核酸酶等<sup>[22][23]</sup>。

当生物被膜成熟后, 菌群通过激活群体感应系统启动程序性解离机制<sup>[24]</sup>。该过程涉及多种基质裂解酶类的协同作用, 包括蛋白酶介导的胞外蛋白水解、酚溶性调节肽 (PSMs) 引发的膜结构去稳定化以及核酸酶对胞外核酸骨架的切割。这种动态解离过程促使微生物由生物膜态向浮游态转化, 实现感染灶的扩散传播<sup>[25]</sup>。除内源性酶解体系外, 生物力学因素如血流剪切应力可破坏被膜-宿主界面粘附, 而宿主基质金属蛋白酶对胞外基质的降解则加速被膜结构的物理性脱落<sup>[24]</sup>。营养限制条件下的实验模型显示, 当环境碳源浓度低于临界阈值时, 菌体通过激活应激响应通路触发被膜解离程序, 引导微生物向营养富集区域迁移<sup>[26]</sup>。值得注意的是, 这种周期性的被膜解离-再定植过程形成动态感染循环, 不仅增强病原体的组织侵袭能力, 更为抗生素耐药基因的水平转移提供温床, 生物被膜的脱落分化有助于新一轮生物被膜的形成<sup>[27]</sup>。

### 1.1.3 金黄色葡萄球菌生物膜形成相关调控机制

金黄色葡萄球菌生物膜动态平衡的维持涉及多层次信号转导网络的协同作用, 其调控机制包含若干关键分子模块: Agr 群体感应系统通过自诱导肽介导的密度依赖性基因表达调控, LuxS/AI-2 通路实现种间通讯的化学信号传导, 以及 Sigma B 等转录调节因子参与的应激响应网络和双组分信号转导系统等<sup>[28]</sup>。这些分子元件通过激活与互作, 精确协调生物膜的形成、维持与解体过程。

#### (1) 群体感应系统

随着细菌的生长繁殖, 细菌会产生一些信号分子, 信号分子的浓度随着细菌种群密度的升高而增加, 达到一定阈值后反作用于细菌使其调节相关基因表达以适应群体变化, 这一现象被称为细菌的群体感应 (quorum sensing, QS)<sup>[29]</sup>。这些信号分子被称为自诱

导物 (Autoinductor, AI), 可以分为以下三种类型<sup>[30][31][32]</sup>: 呋喃糖基硼酸二酯, 又称二型自诱导物 (auto inducer 2, AI-2), 是一种普遍存在于细菌中的群体感应信号分子, 酰基高丝氨酸内酯 (acyl-homoserine lactone, AHL) 是革兰氏阴性菌所特有的信号分子, 而寡肽自诱导因子 (auto-inducer peptide, AIP) 只存在于革兰氏阳性菌中。金黄色葡萄球菌的群体感应系统包括 2 类系统: Agr 群体感应系统和 Lux S /AI-2 群体感应系统<sup>[33]</sup>。

群体感应辅助基因调节 (Accessory gene regulator, Agr) 系统由 RNAII 和 RNAlII 两个转录单位组成, 其中 RNA II 转录单位包含 AgrA、AgrB、AgrC 和 AgrD 四个蛋白元件<sup>[34]</sup>。自诱导物 AIP 由 agrD 编码得到前体, 再经由 AgrB 修饰并转运到胞外。当 AIP 浓度持续升高并达到阈值, AIP 与感应激酶 AgrC 结合并将其激活使其去磷酸化, 转移的磷酸基激活 AgrA, 活化后的 AgrA 通过激活启动子 P2 和 P4 上调 agrBDCA 操纵子和 RNAlII 转录, 促进生物被膜的解离和分散<sup>[35][36][37]</sup>。金黄色葡萄球菌 Agr 群体感应系统通过双组分信号转导通路实现对生物膜的调控: ①下调 MSCRAMMs 等表面黏附因子表达; ②激活蛋白酶/核酸酶等胞外水解酶基因簇转录; ③调控酚溶性调节蛋白 (PSMs) 的表达。其中 AgrA 响应分子作为关键转录调节子, 通过群体密度依赖性方式协调生物膜结构动态平衡<sup>[38]</sup>。研究显示, Agr 系统可调控 Clp P 蛋白酶活性, clp P 基因敲除能增强生物膜形成能力, 基因表达水平也显著增强<sup>[39][40]</sup>。

Lux S/AI-2 群体感应系统是一种在微生物中广泛存在的 QS 系统, 能够介导种内和种间的信号交流, 故又称种间群体感应系统<sup>[41][42]</sup>。该系统受 AI-2 信号分子的调控, 对生物被膜的形成其重要作用。S-核糖同型半胱氨酸酶 (LuxS) 和 S-腺苷同型半胱氨酸核苷酶 (Pfs) 在 AI-2 的合成过程中发挥重要作用。S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 去甲基化后生成的副产物经 Pfs 催化生成 S-核糖同型半胱氨酸 (-ribosylhomocysteine, SRH), SRH 经 LuxS 催化生成极不稳定的 DPD, 即 AI-2 的前体物质, 再通过催化反应最终生成 AI-2 信号分子<sup>[43][44]</sup>。早期研究者认为 Lux S/AI-2 在生物被膜形成中起负向调控作用, 随着研究深入, 人们发现 AI-2 在不同种属菌体中有不同的调控机制, 如 AI-2 在 *S.epidermidis* 菌株中能够上调 icaADBC 转录水平, 但在 luxS 突变株中通过激活 ica R 下调 icaADBC 转录水平<sup>[40][45]</sup>。

## (2) 全局性调控因子

葡萄球菌附属调节因子 A (SarA) 是金黄色葡萄球菌中重要的全局性转录调节因子, 属于 SarA 蛋白家族 (包括 SarA、SarR、SarS 等成员)<sup>[46]</sup>。SarA 蛋白通过螺旋-转角-螺旋 (HTH) 基序和翼状结构域 (W1) 两个结构域与 DNA 结合<sup>[47]</sup>。sarA 基因由 sarA、sarC 和 sarB 三个转录单位组成, 这些转录单位分别由 P1、P2、P3 启动子激活。SarA 通过调控多个毒力因子 (如 a-毒素 (hla)、凝固酶 (coa)、纤维蛋白原结合蛋白 (clfA) 等) 和代谢基因, 影响细菌的致病性和环境适应能力, 其活性受渗透压、pH 等环境因素和 Agr 系统的影响<sup>[48]</sup>。SarA 参与生物被膜形成的调控, 但由于菌株特异性和环境依赖

性,其参与调控不同菌株生物被膜形成的机制有所不同。研究显示, SarA 与 *ica* 操纵子的启动子结合,通过促进 PIA 合成促进生物被膜合成<sup>[49]</sup>。在蛋白质依赖生物被膜形成途径中, SarA 能够抑制胞外蛋白酶(如 Aur、SspA)活性减少其对生物被膜基质的降解<sup>[50]</sup>。SarA 通过抑制自溶素活性减少细胞裂解释放 eDNA,从而影响生物被膜稳定性<sup>[21]</sup>。

Sigma 因子作为全局性调控枢纽,其分子基础来源于 sigB 基因座编码的转录起始因子。该调控蛋白通过与 RNA 聚合酶共价结合形成功能性转录复合体,通过构象转换机制发挥分子开关作用,协调数百个应激响应基因的转录激活<sup>[51]</sup>。Sig B 是金黄色葡萄球菌响应环境压力的重要调控因子,高渗透压、高温和氧化应激等压力环境下的暴露能够激活 SigB 并启动应激响应,帮助细菌在不良环境中生存<sup>[52]</sup>。Sig B 在金葡菌生物被膜形成、色素形成、耐药性和毒力因子表达等调控方面发挥重要作用。研究显示, sig B 基因缺失会显著降低金葡菌生物被膜形成能力<sup>[53][54]</sup>。Sig B 的活性受 Rsb 信号通路的调控,包括 RsbU、RsbV、RsbW 等蛋白。当细菌受到应激刺激时, RsbU 通过催化 RsbV 磷酸化使其激活,活化的 RsbV 与 RsbW 结合从而解除 RsbW 对 SigB 的抑制, SigB 与 RNA 聚合酶结合,启动特定基因的转录<sup>[55]</sup>。

MgrA 作为金黄色葡萄球菌中另一个全局调控因子,能够通过抑制自溶素合成酶基因 (*atl*) 表达,降低细胞壁及细胞质水解活性,从而影响胞外 DNA 的释放及生物膜基质的形成。MgrA 与 Agr 群体感应系统构成双向调控轴,通过磷酸化修饰调控毒力因子的表达。MgrA 通过激活 *sspB* 等蛋白酶编码基因,调节胞外蛋白的合成<sup>[56]</sup>。

### (3) 双组分系统

双组分系统 (two-component systems, TCSs) 是一种在细菌中广泛存在的信号传导机制,能够感应环境变化并通过信号转导调节生理代谢以应对环境变化<sup>[57]</sup>。该系统主要由两部分构成:由组氨酸蛋白激酶 (Histidine protein kinases, HPK) 组成的感应蛋白和由反应调节因子组成的调控蛋白<sup>[58]</sup>。组氨酸蛋白激酶是一个跨膜蛋白,由信号配体结合区、组氨酸磷酸化区和 ATP 结合激酶区三部分构成,信号配体结合区识别信号配体并激活组氨酸磷酸化,活化后的组氨酸蛋白与调节因子结合,并将磷酸基团转移给调节因子,磷酸化的调节因子通过变构与特定 DNA 结合激活转录调控过程<sup>[59]</sup>。

金葡菌中目前已发现的 TCSs 大概有十多种,其中生物被膜形成研究比较多的有 WalKR、SaeRS、ArlRS 和 SrrAB 系统<sup>[60]</sup>。WalKR 系统主要由 WalK 膜结合传感器组氨酸激酶和 WalR 反应调节剂组成,参与金葡菌细胞壁合成和形态维持,能够通过调节编码自溶素和溶菌酶等基因的表达调控细胞壁代谢,是细菌在实验条件下生长和存活所必不可少的<sup>[61][62][63]</sup>。SaeRS 系统参与调控生物被膜黏附蛋白相关基因及多种毒力因子表达,对金葡菌的致病性和免疫逃逸有重要影响<sup>[64]</sup>。ArlRS 系统不仅通过调节 *ica* ADABC 的表达促进生物被膜的形成,还参与金葡菌免疫逃避和毒力因子的调控<sup>[65]</sup>。SrrAB 系统参与金葡菌需氧和厌氧呼吸的调控,在缺氧环境下, SrrAB 能够促进无氧呼吸代谢酶(如