

葡萄糖对表皮葡萄球菌生物被膜形成的影响及调节机制的研究

靳嘉巍¹ 张 力¹ 查锡良^{1*} 李华林² 瞿 涂²

(复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系¹ 卫生部糖复合物重点实验室

² 教育部医学分子病毒学重点实验室 上海 200032)

摘 要 生物被膜(Biofilm)是条件致病菌表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)的主要致病因素,生物被膜的形成依赖多糖 PIA 合成,合成 PIA 的糖基转移酶由 *icaADBC* 基因编码。以生物被膜形成能力不同的菌株为对象,通过研究不同环境对生物被膜形成、细菌总糖量及相关基因表达的变化,探索外界环境对生物被膜形成的影响及葡萄糖对生物被膜诱导的分子机制。有利于生物被膜形成培养条件促进生物被膜形成及多糖的表达,葡萄糖能诱导 *ica* 基因的表达和生物被膜形成,*ica* 基因的反义寡核苷酸(ODN)能对抗葡萄糖的作用,葡萄糖作用下不同生长周期生物被膜形成相关基因 *ica*、*icaR*、*AtlE* 表达不同。表皮葡萄球菌生物被膜的形成与细菌糖代谢有关,葡萄糖通过上调 *ica* 表达诱导生物膜形成,但不需要 *ica* 基因的持续表达,葡萄糖的诱导作用不是直接通过调节 *AtlE* 和 *icaR* 基因来实现的。

关键词 表皮葡萄球菌 生物被膜,多聚 β -1,6-2 脱氧-2-氨基-D-吡喃葡萄糖(PIA),反义寡核苷酸(ODN), *ica*, *AtlE*

中图分类号 Q93 Q75 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2005)03-0431-06

表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)是血浆凝固酶阴性的葡萄球菌(CNS),一般附着在皮肤和粘膜表面,是常见的条件致病菌。近 10 年来表皮葡萄球菌的感染率不断上升,特别是在新生儿和免疫力低下的人群中,现已成为医院重要的感染病原菌之一,而且感染范围广,包括心血管、眼耳鼻喉等的感染,甚至引起败血症而导致病人死亡,因此已引起人们的高度重视^[1,2]。

虽然表皮葡萄球菌分泌的毒性因子较金黄色葡萄球菌少,例如一些破坏组织的蛋白酶,但导致表皮葡萄球菌感染的主要原因在于它粘附在临床上常用的多聚材料上,并形成生物被膜,生物被膜使表皮葡萄球菌感染呈现慢性、持续性和反复性的特点。生物被膜的主要成份为多糖,还包括一些相关的蛋白质,形成生物被膜的多糖主要为线性 β -1,6-2 脱氧-2-氨基-D-吡喃葡萄糖的多聚物(Polysaccharide intercellular adhesion, PIA)^[3]。表皮葡萄球菌多糖的合成在生物被膜形成中扮演重要角色,而 *ica*(Intercellular adhesion)基因是编码多糖合成的糖基转移酶,生物被膜的形成依赖 *ica* 基因的表达和 PIA 的合成。条件致病菌表皮葡萄球菌生物被膜的形成与外界环

境密切相关,环境因素通过调节生物被膜形成相关基因 *ica*, *AtlE* 等的表达影响生物被膜形成的表型,所以研究环境特别是葡萄糖对表皮葡萄球菌的生物被膜影响及其分子机制十分重要^[2]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 实验中采用两株表皮葡萄球菌:97-337 株和 ATCC-12228。97-337 株从表皮葡萄球菌引起的败血症死亡的病人血中分离得到,鉴定为高生物被膜形成的表皮葡萄球菌(结果未发表);ATCC-12228 株为 ATCC 的标准菌株,经鉴定为低生物被膜形成的表皮葡萄球菌。

1.1.2 培养条件 细菌培养基为 TSB(without glucose);TSB+LB(添加不同浓度的葡萄糖,分析纯);LBA^[4]。除特别说明外所有细菌培养均在 37℃ 有氧条件下培养。

1.1.3 主要试剂 TSB、TSB(without glucose)、溶菌酶、蛋白酶 K 均购自 Sigma 公司, Yeast Extract、Tryptone 购自 OXOID 公司, TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司,逆转录酶 AMV 和随机引物购自 Promega 公司。

基金项目 国家 863 计划(2001AA223011)

* 通讯作者。Tel:86-21-54237696;E-mail:xlzha@shmu.edu.cn

作者简介 靳嘉巍(1977-)男,云南人,硕士研究生,从事分子生物学研究。E-mail:jwjw@shmu.edu.cn

收稿日期 2004-10-08,修回日期 2005-01-27

1.2 生物被膜形成测定

37℃过夜振摇培养的表皮葡萄球菌 1:200 接种于 96 孔板中,37℃无振摇培养 24h 后,按文献^[5]测定生物膜。

1.3 表皮葡萄球菌的厌氧培养

将振摇培养过夜的表皮葡萄球菌 1:100 接种于 96 孔培养板中,将 96 孔培养板放入充满氮气的培养装置中 37℃培养 24h 后用于细菌粘附测定^[5,6]。

1.4 细菌总糖和总蛋白抽提和定量

用 SDS 碱裂解法提取细菌总蛋白^[4]。蛋白定量采用 Lowry 法^[4]。用硫酸苯酚法测定细菌总糖^[7]。

1.5 菌体基因组 DNA 提取

37℃振摇培养过夜的表皮葡萄球菌,按文献^[4,8]提取基因组 DNA。

1.6 *ica* 基因检测

按文献^[9]中的 PCR 方法检测表皮葡萄球菌 *ica* 基因。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物。

1.7 菌体总 RNA 抽提

离心收集不同条件下培养的表皮葡萄球菌后,用 TRIzol 重悬菌体,加入专用的研磨剂后高速振摇,以后的 RNA 提取按 Invitrogen 提供的关于 TRIzol 试剂的使用方法操作^[10]。为分析不同浓度的葡萄糖对基因 *icaAB* 的影响,分别收集培养皿中培养 6h 和 24h 的细菌,用于抽提 RNA 和 RT-PCR。为分析在不同的生长期葡萄糖对 *ica* 基因表达的影响,收集 3h、6h、10h、16h 培养皿中的细菌用于抽提 RNA 和 RT-PCR。为分析葡萄糖作用不同时间对生物被膜相关基因的影响,在不同的时间点加入葡萄糖,然后收集 24h 后的培养皿中的细菌用于抽提 RNA 和 RT-PCR^[10]。

1.8 基因 mRNA 水平测定

应用 RT-PCR 方法检测 *ica* 基因 mRNA 水平。用逆转录酶 AMV 和随机引物并按照公司提供的操作手册将表皮葡萄球菌的 RNA 逆转录为 cDNA,以 PCR 检测相关基因,所用引物为: *icaAB*-F 5'-TTATCAATGCCGCAGTTGTC-3', *icaAB*-R 5'-TTTGCTTCTGTGATACGGTTG-3'; *icaR*-F 5'-CTCGAATTGTGTTACATACTAG-3', *icaR*-R 5'-TTGGATAGAAAAGTAAAAAG-3'; *AtIE*-F 5'-CAACTGCTCAACCGAGAACA-3', *AtIE*-R 5'-TTTGTAGATGTTGTGCCCA-3'; 16S rRNA-F 5'-ACTCAAAGGAATTGACGGGG-3', 16S rRNA-R 5'-AGACCCGGGAACGTATTAC-3'。

PCR 的反应体系为 50 μ L,反应条件 94℃ 5min; 94℃ 1min 55℃ 1min 72℃ 1min 20 个循环;72℃

10min^[9],并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物。

1.9 设计抑制 *ica* 基因表达的反义寡核苷酸抑制生物被膜形成

根据 *icaA* 基因的序列(U43366)设计反义寡核苷酸,并在细菌基因组中进行 Blast,找到两段特异性较高的序列:sense1-17:ATGCATGTATTTAACTTT;sense60-79:CTGGATAGTAGGATCGATTT,对两段序列进行二级结构分析显示无很稳定的二级结构,根据以上序列合成全硫代反义寡核苷酸:anti1-17 和 anti60-79。在含有不同浓度的反义寡核苷酸的培养基中作用不同时间,测定在不同浓度中作用不同时间的生物被膜的产生情况^[13]。

2 结果

2.1 两株表皮葡萄球菌生物被膜形成能力的比较

从病人身上分离得到的菌株 97-337 株为高生物被膜形成的菌株,而 ATCC 的标准菌株生物被膜形成能力较之为低,几乎没有生物被膜形成。

2.2 不同培养条件下两株表皮葡萄球菌总糖量的比较

上述结果提示两株表皮葡萄球菌的生物被膜形成的能力不同,而生物被膜的主要成份为多糖,为了观察生物被膜形成高低与细菌总糖的关系,进行总糖量的比较。分别在有利于生物被膜形成的塑料培养皿中粘附性培养和不利于生物被膜形成的振摇培养,因为随细菌生长蛋白质的变化不大故可作为细菌量的参数,通过检测细菌总糖量和总蛋白质质量的比率来反映细菌总糖的变化,结果发现在有利于生物被膜形成的条件下高生物被膜形成的 97-337 株总糖量明显高于低生物被膜形成的 ATCC-12228 株,但在悬浮振摇培养条件下两株细菌的总糖量没有明显的差别,说明生物被膜形成强时,其总糖量也增加。表皮葡萄球菌生物被膜形成与其糖密切相关,进一步考察通过加入外源葡萄糖影响细菌糖代谢后对生物被膜形成变化的影响。

2.3 外源葡萄糖对两株细菌生物被膜形成能力的影响

培养基中添加的葡萄糖诱导了表皮葡萄球菌 97-337 生物被膜的形成,而且随葡萄糖浓度的增加 0.125%~1%,对生物被膜形成的影响不同。葡萄糖对 97-337 生物被膜的形成有较强的诱导作用,在添加 0.25% 的葡萄糖时表皮葡萄球菌的生物被膜形成能力最强,为没有添加葡萄糖的 30 倍;当葡萄糖浓度进一步增加(大于 0.5%)其诱导生物被膜形

成能力反而下降而葡萄糖浓度变化对 ATCC-12228 的生物被膜形成无明显影响。

2.4 厌氧环境对两株细菌生物被膜形成的影响

通常厌氧环境对细菌能量代谢有很大的影响 ,特别是降低葡萄糖的有氧氧化后 ;为进一步证明葡萄糖对生物被膜的诱导作用 ,考察在增加细菌对糖需求的厌氧环境下葡萄糖对生物被膜诱导作用的变化。研究发现在厌氧环境中表皮葡萄球菌 ATCC-12228 生物被膜的形成不受影响。厌氧环境对 97-337 株的生物被膜的形成有诱导作用 ,不同的葡萄糖浓度对 97-337 的粘附能力的诱导也与有氧环境不同 ,在低浓度葡萄糖下影响较为明显 ,增加了 97-337 株生物被膜形成对葡萄糖作用的敏感度(图 1)。

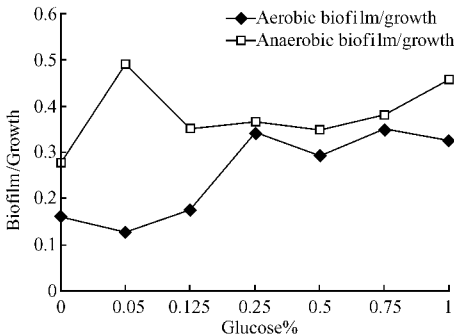


图 1 在厌氧环境中葡萄糖对两株表皮葡萄球菌生物被膜形成的影响 ,在有氧和厌氧条件下表皮葡萄球菌 97-337 粘附与细菌生长的比例

Fig.1 The ratio of biofilm to growth in anaerobic environment in aerobic and anaerobic respectively in the media with different glucose concentration

2.5 两株表皮葡萄球菌生物被膜形成相关基因的比较研究

两株生物被膜的表型上的差异是否与生物被膜形成相关基因 *ica* 有关 ,通过设计一对引物用 PCR 方法合成跨 *icaA* 和 *icaB* 的一段序列检测两株表皮葡萄球菌基因组 *ica* 基因^[9]。在生物被膜形成能力低下的 ATCC-12228 株基因组 DNA 中没有检测到 *icaA* 基因 ,说明 *icaA* 基因缺失或突变 ;在高生物被膜形成的 97-337 株基因组 DNA 中能检测到 *icaA* 的存在。

2.6 葡萄糖对表皮葡萄球菌 97-337 *icaAB* 基因表达的影响

葡萄糖能诱导生物被膜的形成 ,而且两株细菌生物被膜表型的差异与 *ica* 基因有关 ,为进一步考察葡萄糖对生物被膜的影响是否通过 *ica* 基因 ,用 RT-PCR 的方法检测 97-337 株在不同葡萄糖浓度的生长条件下 6h 和 24h *icaAB* 基因 mRNA 表达水

平^[9]。结果发现在添加葡萄糖培养基中生长的 97-337 表皮葡萄球菌 6h 时 *ica* 基因 mRNA 水平明显高于未添加葡萄糖培养基生长的表皮葡萄球菌 ,葡萄糖对 *ica* 基因的表达与生物被膜形成的影响一致 ;但作用 24h 后 *ica* 基因 mRNA 水平明显与葡萄糖短时作用 6h 不同 ,表明 *icaAB* 的表达与生物被膜的形成直接相关。(图 2)

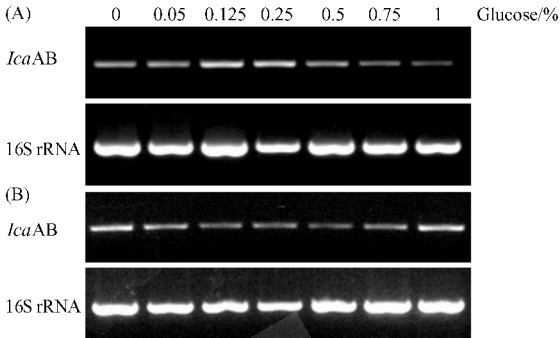


图 2 用 RT-PCR 检测葡萄糖对表皮葡萄球菌 97-337 *icaAB* 基因表达的影响

Fig.2 Different levels of transcription of in *S. epidermidis* 97-337 cultured in the media with different glucose concentration

A :The *icaAB* transcription level in *S. epidermidis* 97-337 cultured for 6h ;
B :The *icaAB* transcription level in *S. epidermidis* 97-337 cultured for 24h.

2.7 反义寡核苷酸对生物被膜形成的作用

多糖 PIA 是生物被膜形成的关键因素之一 ,为抑制生物被膜的形成和进一步说明葡萄糖对生物被膜的诱导作用是通过 *ica* 基因 ,选取参与多糖合成的 *icaA* 基因的下列两段序列 ,并参照这些序列合成的反义寡核苷酸 :anti1-17 和 anti60-79 ,以研究不同浓度的反义寡核苷酸对高生物被膜形成的表皮葡萄球菌 97-337 株作用不同时间后生物被膜形成的变化。作用位点在 *icaA* 起始密码子附近的 anti1-17 对生物被膜形成的抑制效果不很明显 ,抑制率在 25.6% ~ 14.4% 之间 ,在短时处理时对生物被膜的形成有抑制 ,而长时间处理时没有效果 ;但是 ODN

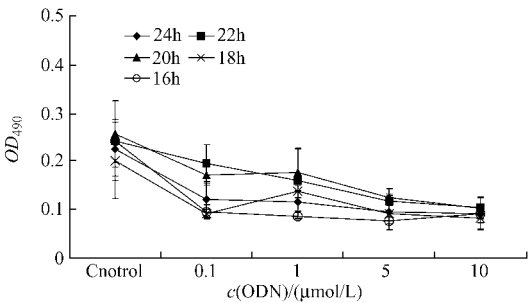


图 3 反义寡核苷酸对 97-337 株生物被膜形成的影响

Fig.3 The biofilm formatted by *S. epidermidis* 97-337 in the media with ODN anti1-17

anti1-17 能够明显对抗葡萄糖对生物被膜的诱导作用 ,抑制百分率在 69% ~ 21% ,随着 ODN 浓度增大效果越明显(图 3)。离起始密码子较远的 anti60-79 对生物被膜形成的抑制效果不明显 ,在 16h 平均抑制百分率为 6% ,只能微弱对抗葡萄糖对生物被膜形成的诱导作用 ,平均抑制百分率为 10%。

2.8 表皮葡萄球菌在添加葡萄糖的 TSB 培养基中不同生长期 *icaAB* 基因的 mRNA

通过生长试验我们可知生长 early-exponential 为 3 ~ 4h ,mid-exponential 为 5 ~ 6h ,post-exponential 为 9 ~ 10h ,stationary 为 16h。葡萄糖对 *ica* 基因的诱导作用只在 early-exponential 和 mid-exponential 期 ,而在细菌生长的 stationary 期葡萄糖作用下 *ica* 基因的表达量降低 ,但是葡萄糖作用 24h 后明显诱导生物被膜的形成 ,表明 *ica* 基因的表达与生物被膜的形成直接相关但是并不需要持续表达(图 4)。

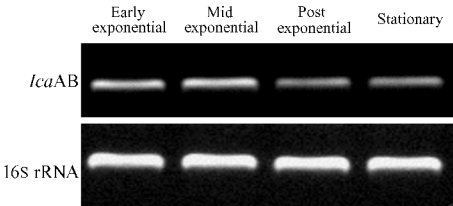


图 4 RT-PCR 检测在 0.25%葡萄糖 LB 培养基中表皮葡萄球菌不同生长期 *icaAB* 的 mRNA 表达

Fig.4 The expression of *icaAB* of bacterial cultivated in LB media with 0.25% glucose for vary time according to the growth phrase RNA was extracted at the early-exponential (after 3 ~ 4h) , mid-exponential(5 ~ 6h) , post-exponential(9 ~ 10h) ,and stationary(16h) phases of growth

2.9 葡萄糖不同的处理时间对表皮葡萄球菌 97-337 株生物被膜形成及生物被膜形成相关基因表达的影响

在添加葡萄糖的 TSB 培养基中 ,葡萄糖作用 1 ~ 6h对生物被膜诱导作用不明显 ,但是作用 6h 后 *ica* 基因的表达量较高 ;葡萄糖诱导生物被膜的形成是通过诱导 *icaAB* 基因的表达 ,与多糖合成直接相关的基因 *icaAB* 和调控基因 *icaR* , *agr* , *AtlE* 在葡萄糖作用不同时间的表达呈现一定的规律 ,葡萄糖作用 6h 后 PIA 合成直接相关的 *icaA* 基因表达量最大 随后则逐渐降低 这与葡萄糖作用后在不同生长周期的 *icaA* 表达基本一致 ,而作为 *ica* 操纵子表达负性调控因子 *icaR* 的表达与整个 *ica* 操纵子的表达基本一致 ,说明葡萄糖对生物被膜的诱导并不通过调节 *icaR* 基因的表达。 *AtlE* 基因的表达随着细菌生长周期的变化而发生微小变化(图 5)。

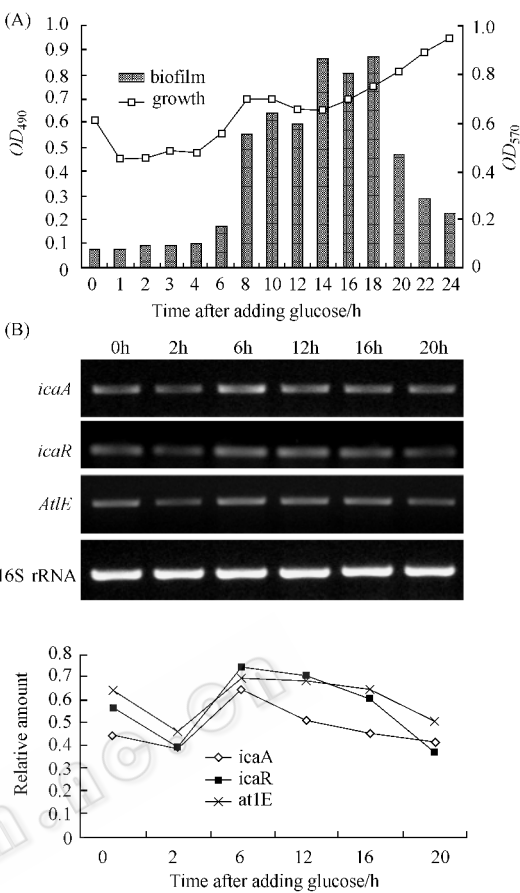


图 5 (A)在添加 0.25%葡萄糖的 TSB 培养基中对不同处理时间 97-337 株生物被膜形成 (B)在添加 0.25%葡萄糖的 TSB 培养基中对不同处理时间 97-337 株中生物被膜形成相关基因的 mRNA 表达水平 ,并将条带量化后以不同基因与 16-srRNA 表达量的比值为纵坐标作图

Fig.5 (A) Biofilm of *S. epidermidis* 97-337 cultured in TSB with 0.25% glucose in different time after glucose stimulate ; (B) Expression of gene concerning biofilm in *S. epidermidis* 97-337 cultured in TSB with 0.25% glucose after stimulated by glucose(0.25%) , and in the following graph the expression level of a gene is indicated by ratio of densitometric value of the gene band to that of 16srRNA

3 讨论

粘附在临床上常用的多聚材料上并形成生物被膜是表皮葡萄球菌感染的必需过程 ,并与表皮葡萄球菌感染的慢性、持续性和反复性特点有关 ,因此 ,生物被膜形成机制的研究已成为抗表皮葡萄球菌感染研究的中心问题。表皮葡萄球菌 PIA 的合成是生物被膜形成的关键 ,PIA 多糖的合成与 *icaADBC* 操纵子基因有关^[11]。总糖测定的试验的结果提示 ,表皮葡萄球菌的糖代谢与生物被膜的形成可能有很大

关联。

葡萄糖对生物被膜形成有很强的诱导作用,葡萄糖不仅刺激了细菌的生长而且同时诱导了生物被膜的形成。葡萄糖长时作用能刺激细菌生长而对生物膜的诱导作用下降,这提示葡萄糖对生物膜的诱导除与刺激生长相关外还存在其他机制。在高浓度时葡萄糖的诱导作用反而不强可能说明生物被膜的形成与外界的渗透压有关,因为高浓度的葡萄糖可能影响了细菌生长外环境的渗透压。对细菌糖代谢的影响很大的厌氧环境诱导了生物膜的形成和增加细菌生物被膜形成对葡萄糖的敏感性进一步说明葡萄糖对生物被膜形成的影响是通过影响细菌糖代谢。细菌的糖代谢与细菌多糖的合成和生物被膜的形成密切相关。

ica 基因编码参与是 PIA 合成的糖基转移酶,*ica* 基因是典型的原核操作子的结构,*Ica* 操作子包括调节基因 *IcaR* 和结构基因 *icaADBC*;低生物被膜形成的表皮葡萄球菌主要由于 *icaA* 基因缺失。葡萄糖是通过直接或间接诱导糖链合成相关基因 *ica* 基因的表达而诱导生物被膜的形成。特异性针对 *ica* 基因反义寡核苷酸能明显抑制葡萄糖的诱导作用进一步证实葡萄糖对生物被膜的诱导作用是通过诱导 *ica* 基因的表达。葡萄糖的诱导作用与细菌生长周期相关,葡萄糖对 *ica* 的诱导作用只在 Early-exponential 和 Mid-exponential 期,但是葡萄糖作用 24h 后明显诱导生物被膜的形成,推测生物被膜的形成和 PIA 的合成不需要 *ica* 基因的连续的表达,而且生物被膜的形成除了 *ica* 外还需要其他的因子的表达。

葡萄糖对生物被膜的诱导作用不是持续过程,葡萄糖的诱导作用在 6h 后对表型就有表现,而 20h 的诱导作用下降,可能与细菌密度依赖的 *agr* 等调节机制相关,葡萄糖对生物膜的诱导存在复杂调控机制。葡萄糖作用不同时间后,作为 *ica* 基因表达的负性调控因子的 *icaR* 的 mRNA 表达量的变化与 *icaA* 基因表达并不呈现负相关,说明葡萄糖对 *ica* 基因的调控并不是通过 *icaR* 来调控 *icaADBC* 的表达和 PIA 的合成,通过其他与 *icaR* 不相关的调控机制,例如通过 *sigB*。自溶素蛋白 *AtlE* 的主要功能是降解细胞壁的肽聚糖成份,*AtlE* 定位在细胞表面通过非共价结合参与表皮葡萄球菌的向多聚材料的粘附,所以对生物膜的调控可以通过调控 *AtlE* 的表达来实现。在收集表皮葡萄球菌前 2h 加入葡萄糖,*AtlE* 基因的表达量下降,推测由于这可能与 *AtlE* 参

与细菌细胞壁代谢有关,因为加入葡萄糖后能刺激细菌生长。通过不同时间作用发现 0.25% 葡萄糖对 97-337 株 *AtlE* 基因表达影响不大,说明葡萄糖对生物膜形成的诱导作用主要并不是通过调节 *AtlE* 基因表达来实现的。

葡萄糖对生物被膜的诱导作用主要是通过诱导 *ica* 基因的表达和多糖 PIA 的合成,但对 *ica* 基因表达的调控不是通过下调 *icaR* 的表达,而且 *ica* 基因的表达有周期性,并不持续表达,这与 *ica* 表达产物为定位在细胞膜上的糖基转移酶有关;生物被膜的形成肯定需要其他基因的持续表达,而且可能与葡萄糖作用有关,但可能并非为葡萄糖调节特异性。PIA 的合成是生物被膜形成的关键,葡萄糖对生物被膜的诱导作用等结果表明表皮葡萄球菌糖代谢与生物被膜形成有很密切的关系。作为条件致病菌的表皮葡萄球菌的生物被膜形成与环境密切相关,其表型的改变是通过对环境的反应调节相关基因的表达,而这是一个复杂的过程,不同的外界因素有不同的信号转导机制。

参 考 文 献

- [1] Vandecasteele S J, Peetermans W E, Merckx R, et al. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during *in vitro* and *in vivo* foreign body infections. *The Journal of Infectious Diseases* 2003 **188** :730 - 737.
- [2] Christof von Eiff, Georg P, Christine H. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative *Staphylococci*. *Lancet Infect Dis* ,2002 **2** : 677 - 685.
- [3] Mack D, Fischer W, Krokotsch A, et al. The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* ,1996 **178** (1):175 - 183.
- [4] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南. 黄培堂,等译. 第三版. 北京:科学出版社,2002.
- [5] Ziebuhr W, Heilmann C, Gotz F, et al. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* ,1997 **65** (3):890 - 896.
- [6] Cramton S E, Ulrich M, Gotz F, et al. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* ,2001 **69** (6): 4079 - 4085.
- [7] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海:上海科学技术出版社,1987.
- [8] Mack D, Nedelmann M, Krokotsch A, et al. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* ,1994 **62** (8):3244 - 3253.

- [9] Frebourg N B , Lefebvre S , Baert S , *et al.* PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol* ,2000 **38**(2) 877 – 880.
- [10] Dobinsky S ,Mack D. Efficient RNA isolation method for analysis of transcription in sessile *Staphylococcus epidermidis* biofilm cultures. *Methods Enzymol* , 2001 **336** 255 – 262.
- [11] Christiane G , Angelika K , Roderich S. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity Involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* ,1998 ,**273**(29) :18586 – 18593.
- [12] Mack D , Rohde H , Dobinsky S ,*et al.* Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun* , 2000 ,**68**(7) 3799 – 3807.
- [13] Gunter H , Paul C Z , Tang J. Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity , formation of the poly-L-glutamateylglutamine cell wall structure and bacterial replication. *PNAS* , 2000 ,**97**(1) 1418 – 1423.

Effect of glucose on biofilm and the gene *ica* expression in *Staphylococcus epidermidis* with different biofilm-forming capability

JIN Jia-wei¹ ZHANG Li¹ ZHA Xi-liang^{1*} LI Hua-lin² QU Di²

(¹ Key Laboratory of Glycoconjugate Research of Ministry of Public Health ;² Key Laboratory of Medical Molecular Virology of Ministry of Education Shanghai Medical College , Fudan University , Shanghai 200032 , China)

Abstract : The infection of *S. epidermidis* , an opportunistic human pathogen , depends on biofilm formation , and biofilm formation is closely related to environment . Researches in the thesis focused on two strains of *S. epidermidis* with different capability of biofilm formation . To find the mechanism of response to environment on biofilm formation , biofilm formation and expression of *ica* , *icaR* , *AtIE* in these *S. epidermidis* cultivated in different grow environment and in media with glucose for different time were assayed . Glucose can induce the biofilm formation by inducing *ica* gene , but the inducing do not need continued *ica* expression , and other genes also contribute to the regulation ; anti-ODN specially binding *icaADBC* can withstand biofilm inducing from glucose . These results suggest that biofilm formation closely related to growth environment , which is a complex regulation mechanism . Biofilm formation is closely related to bacteria energy metabolism and cell wall synthesis . Some crucial factors in the complex and integrated regulation system have not been known yet .

Key words : *Staphylococcus epidermidis* , Biofilm , Polysaccharide intercellular adhesion (PIA) , ODN , *AtIE* , *ica*

Foundation item : National Programs for high Technology Research and Development of China (2001AA223011)

* Corresponding author . Tel 86-2154237696 ; E-mail : xlzha@shmu.edu.cn

Received data : 10-08-2004

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>