

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

姜鹏, 路新枝, 侯方杰, 刘湛军, 于文功*

中国海洋大学医药学院, 海洋药物教育部重点实验室, 青岛 266003

摘要:【目的】构建金黄色葡萄球菌 RN6390 黄素血红蛋白 (flavo-haemoglobin, HMP) 基因缺失突变株, 研究其抗一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 能力及其在细菌生物被膜形成中的作用。【方法】根据同源重组技术的原理, 利用 PCR 扩增 RN6390 的 *hmp* 基因上下游同源臂, 经过抗生素和温度交替培养筛选 *hmp* 基因缺失突变株, 利用基因组 PCR、定量 PCR 对突变菌株进行鉴定。以硝普钠 (SNP) 为 NO 供体, 检测了 *hmp* 基因缺失菌株的抗 NO 能力, 并初步研究了 *hmp* 基因在生物被膜形成中的作用。【结果】成功构建了 RN6390 的 *hmp* 基因缺失突变株, 外源 NO 能够诱导菌株 *hmp* 基因的表达, *hmp* 基因缺失菌株抗 NO 能力明显下降, 但其生物被膜形成能力有明显提高。【结论】获得了 RN6390 的 *hmp* 基因缺失突变株, 该突变株的获得为进一步研究 *hmp* 基因的生物功能, 以及细菌内源性 NO 的作用奠定了良好的技术平台。

关键词: 金黄色葡萄球菌, 黄素血红蛋白 (HMP), 缺失突变株, 一氧化氮, 生物被膜

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0196-07

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是人类化脓感染中最常见的病原菌, 可引起肺炎、心包炎, 甚至败血症、脓毒症等全身感染, 也是造成人类食物中毒的常见致病菌之一^[1]。宿主自身先天免疫系统包括诱导性一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 系统释放的 NO 是有效抗击外来微生物入侵的第一道防线, NO 可以直接抑制微生物的有氧呼吸能量代谢, 并抑制微生物的 DNA 复制^[2–4], 然而, 金黄色葡萄球菌区别于其他非致病性葡萄球菌的一个主要特征就是其能够抵抗 NO 的毒性^[5]。研究发现黄素血红蛋白及与其处于同一操纵子的乳酸脱氢酶可能是金黄色葡萄球菌 NO 脱毒的主要物质^[6]。

动物体内血红蛋白的生理功能已经十分明确, 然而微生物中血红蛋白的研究进展却相对缓慢, 微生物血红蛋白包括单结构域的珠蛋白和双结构域的黄素血红蛋白。HMP 蛋白广泛存在于细菌和酵母中, 其 N 端具有一个血色素类的结构域 (包括一个 B 型亚铁血红素), C 端为铁氧化还原蛋白 NADP⁺ 还原酶类结构域 (包括一个 FAD 基团和 NADPH 结合域)^[7–8]。研究发现大肠杆菌的黄素血红蛋白在有氧条件下能将 NO 转化为 NO₃⁻, 在缺氧条件下还原为 N₂O, 在保护菌体抵御 NO 和硝化压力方面发挥重要的作用^[9–10]。与革兰氏阴性菌不同, 金黄色葡萄球菌除了具有 *hmp* 基因, 还存在 NOS 类基因^[11], 那么 HMP 蛋白和 NOS 蛋白的功能是否冲

基金项目: 国家“863 计划” (2007AA09Z418, 2007AA091506)

* 通信作者。Tel: +86-532-82031680; E-mail: yuwg66@ouc.edu.cn

作者简介: 姜鹏 (1981–), 女, 山东青岛人, 博士研究生, 主要从事微生物学与分子生物学方面的研究。E-mail: jp886@163.com

收稿日期: 2010-09-14; **修回日期:** 2010-11-22

突,HMP 蛋白是否还具有 NO 脱毒功能,为了阐明 *hmp* 基因在金黄色葡萄球菌中的生物学功能及其与内源性NOS的关系,本文利用同源重组技术构建了 RN6390 的 *hmp* 基因缺失突变株,并比较了野生株和突变株抗 NO 的能力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基:菌株 RN4220 是限制性内切酶缺陷的金黄色葡萄球菌,可以接受来自大肠杆菌的穿梭质粒,由西班牙的 Iñigo Lasa 教授惠赠。菌株 RN6390 是由英国 The Rockefeller University 的 Ambrose Cheung 教授惠赠。穿梭表达载体 pMAD,是由法国 Institute Pasteur 的 Michel Débarbouillé 教授惠赠。大肠杆菌质粒 pMD-18T 购

自大连 Takara 公司;含有壮观霉素抗性基因(*spc*)的质粒 pUS19 由美国 The University of Texas 的 Shuyu Zhang 教授惠赠。大肠杆菌培养采用 Luria-Bertani (LB)培养基(青岛生物工程科技有限公司),金黄色葡萄球菌采用 Tryptone Soya Broth(TSB)培养基(北京陆桥技术有限公司)。抗生素的使用浓度分别为:氨苄青霉素 100 mg/L,红霉素 5 mg/L,壮观霉素 100 mg/L。

1.1.2 试剂:溶葡萄球菌酶和抗生素购自 Sigma 公司,β-1,6-N-乙酰氨基葡聚糖降解酶(DspB)由本实验室制备,核酸提取试剂盒购自 DBI 公司,引物的合成和基因序列测定由北京华大基因有限公司完成,分子克隆相关试剂购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 PCR 引物:引物的序列及克隆位点如表 1。

表 1 PCR 引物序列及用途

Table 1 The sequences and functions of primers					
Primers	Primer sequences(5'→3')	Restriction site	Length/bp	Template	Introductions
Primer 1	GGATCCCAACTCAGTAGAAGGGGC	<i>Bam</i> HI	568	RN6390 chromosome	Amplification of the upstream of <i>hmp</i> gene
Primer 2	GTCGACAATTACGATATGGATCGC	<i>Sai</i> I			
Primer 3	GAATTCTAAGTAAAGGCACCGTTT	<i>Eco</i> RI	499	RN6390 chromosome	Amplification of the downstream of <i>hmp</i> gene
Primer 4	AGATCTAGGTCATGTGTCATCCG	<i>Bg</i> zII			
Primer 5	GTCGACCAAGGGTTTATTGTTTTCTAAAA	<i>Saz</i> I	1146	pUS19	Amplification of Spectinomycin resistance gene
Primer 6	GAATTCTTTTCGTTTCGTGAATACATGTT	<i>Eco</i> RI			
Primer 7	TCTAATACGAATCCACCTAC		539	RN6390 Δ <i>hmp</i> chromosome	primers to detect <i>hmp</i> gene
Primer 8	AAACCAGTCATTATGCCAGT				
Primer 9	GGCGATTTTACCATTACGAGG		118	RN6390 Δ <i>hmp</i> chromosome	real time-PCR primers of the housekeeping gene <i>gyrB</i>
Primer 10	GCCACCGATTCTGTACCAA				
Primer 11	AAATGTTTAAAGCGCATCCTGAA		99	RN6390 Δ <i>hmp</i> chromosome	real time-PCR primers to detect <i>hmp</i> expression
Primer 12	CGGCCATTACAGCTTGTGCTA				

1.2 打靶载体 pMADΔ*hmp* 的构建

根据金黄色葡萄球菌 8325-4 (RN6390 的母株),使用 Primer Premier 5 软件,设计 RN6390 *hmp* 基因上游和下游同源臂 up 和 down 的引物,分别为 primer1-primer2, primer3-primer4。根据质粒 pUS19^[12] 设计了抗性基因 *spc* 的引物 primer5, primer6。分别以 RN6390 基因组和质粒 pUS19 为模板,利用 PCR 扩增 *hmp* 基因上下游同源臂(约 0.56 kb,0.5 kb)和抗性基因 *spc*(约 1.2 kb),产物酶切后经过琼脂糖凝胶电泳回收,依次连入 pMAD(约 10 kb)载体中^[13],获得重组载体 pMADΔ*hmp*。

1.3 打靶载体的电击转化

金黄色葡萄球菌感受态细胞制备参考文献^[14] 并加以修改,利用细菌在 600 nm 处的吸光(*OD*₆₀₀)测量细菌培养液的浓度,过夜生长的金黄色葡萄球

菌按 1% 的体积接入 100 mL 新鲜无菌 LB 培养基中,同时加入 0.1 U/mL 的 DspB,37℃ 震荡培养,待生长到 *OD*₆₀₀ 约为 0.6–0.8 时,加入 300 mg/L 的溶菌酶于 37℃ 孵育 30 min,常温下,2500 × g 离心 10 min,收集菌体,依次用灭菌去离子水和 10% 甘油洗涤,最后使菌体悬浮于 1 ml 的 10% 甘油中,分装,–80℃ 冻存。

打靶载体先经过电击转化入金黄色葡萄球菌 RN4220 中,经过修饰后再转入菌株 RN6390。电击条件及筛选过程参考文献^[15],重组过程如图 1。

1.4 金黄色葡萄球菌 RN6390 的 *hmp* 基因缺失突变株鉴定

1.4.1 PCR 鉴定:为了检测 *hmp* 基因是否被 *spc* 基因替代而缺失,分别以突变株 RN6390Δ*hmp* 与野生株 RN6390 的基因组 DNA 为模板,以 primer5 和

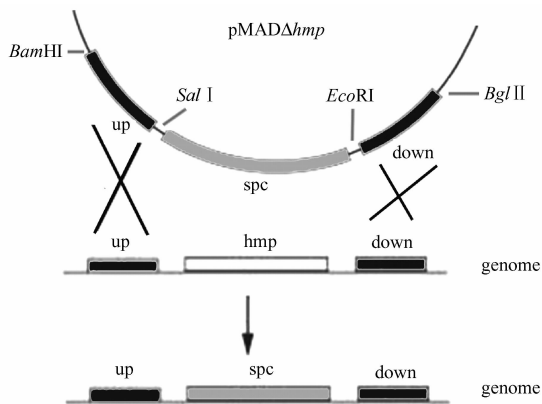


图1 同源重组过程示意图

Fig. 1 The process of homologous recombination

primer6, primer7 和 primer8 为引物进行 PCR 扩增。

1.4.2 序列测定鉴定:以所筛选的 RN6390 的 *hmp* 基因突变株的基因组为模板,用引物 primer1, primer4 进行 PCR,将扩增到的产物连接入 T-Vector,测序。

1.4.3 定量 PCR 检测 *hmp* 基因的表达:提取 RN6390 和 RN6390Δ*hmp* 的总 RNA,方法参照试剂盒加以改进。菌体沉淀用 DEPC 水重悬,加入终浓度为 300 mg/L 溶葡萄球菌酶,37℃ 孵育 30 min 后按照试剂盒说明书提取 RNA。提取得到的 RNA 经过反转录得到 cDNA。采用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测 *hmp* 基因在 mRNA 水平上的表达。以管家基因 *gyrB* (DNA 促旋酶的 B 亚单位蛋白编码基因) 为内参,用引物 primer9 和 primer10, primer11 和 primer12 进行定量 PCR。

1.5 外源添加 NO 对金黄色葡萄球菌 RN6390 *hmp* 基因表达的影响

在 5 mL 无菌新鲜 TSB 培养基中培养 RN6390 过夜,用无菌新鲜 TSB 培养基调节至相同菌体密度 OD₆₀₀ 到 0.01,分别取 200 μL 加入 96-well 细胞培养板中,随后加入终浓度分别为 500 μmol/L, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 8 mmol/L 的 NO 供体 SNP, 37℃ 静置培养 22 h,提取总 RNA,实时荧光定量 PCR 检测 *hmp* 基因的表达变化。

1.6 金黄色葡萄球菌 RN6390 *hmp* 基因缺失突变株对外源 NO 耐受性的检测

过夜培养野生型金黄色葡萄球菌 RN6390 及其 *hmp* 基因缺失突变株 RN6390Δ*hmp*,用无菌新鲜 TSB 培养基调节至相同菌体密度 OD₆₀₀ 到 0.01,分

别取 200 μL 加入 96-well 细胞培养板中,随后加入不同浓度的 NO 供体 SNP, 37℃ 静置培养 22 h,充分悬浮菌体后,使用酶标仪检测 600 nm 处的吸光值。

1.7 金黄色葡萄球菌 RN6390 *hmp* 基因缺失突变株生物被膜形成能力的检测

金黄色葡萄球菌生物被膜形成和检测如文献^[16],过夜培养的金黄色葡萄球菌,用含 0.5% 葡萄糖的新鲜无菌 TSB 培养基稀释至合适的浓度,按每孔 100 μL 加入无菌的 96-well 细胞培养板中,密封后 37℃ 静置培养 22 h,小心吸出上清,去离子水清洗 3 遍,用 150 μL 0.1% 结晶紫染色 5 min,水洗,33% 冰乙酸溶解结晶紫,在 590 nm 处测吸光值。

2 结果和分析

2.1 打靶载体的构建和鉴定

对经测序正确的 PCR 产物进行酶切,通过连接,分别将 *hmp* 基因上下游片段连在 *spc* 抗性基因两侧,最终克隆入 pMAD 载体构建成打靶载体 pMADΔ*hmp*,通过 PCR 和酶切对此载体进行鉴定。PCR 鉴定结果显示,以 pMADΔ*hmp* 为模板 PCR 扩增能够得到 up, down, *spc* 相应大小的片段,而以 pMAD 为模板则没有扩增产物。用不同的限制性内切酶酶切打靶载体,可以分别得到 up-*spc*-down, *spc*, up, down 相应大小的酶切片段。这些结果表明打靶载体 pMADΔ*hmp* 构建成功。

2.2 金黄色葡萄球菌 RN6390 *hmp* 基因缺失突变株的构建和鉴定

2.2.1 金黄色葡萄球菌 RN6390 的 *hmp* 基因缺失突变株的构建:利用电击转化法将金黄色葡萄球菌 RN4220 修饰过的打靶载体 pMADΔ*hmp* 转入金黄色葡萄球菌 RN6390,经抗生素和蓝白斑筛选,对阳性克隆进行质粒提取和酶切鉴定,挑选正确的克隆先后经 30℃ 双交换和 40℃ 质粒丢失,最终得到金黄色葡萄球菌 RN6390 的 *hmp* 基因缺失突变株。

2.2.2 金黄色葡萄球菌 RN6390 *hmp* 基因缺失突变株的 PCR 鉴定和序列鉴定:分别以突变株 RN6390Δ*hmp* 与野生株 RN6390 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,结果如图 2-A 所示,采用引物 primer1 和 primer4,在 RN6390 和 RN6390Δ*hmp* 分别得到约 2.1 kb (up-*hmp*-down) 和 2.2 kb (up-

spc-down) 的片段,采用引物 primer5 和 primer6, primer5 和 primer4, primer1 和 primer5 分别在 RN6390 Δ hmp 扩增出 1.2 kb (spc), 1.65 kb (spc-down) 和 1.7 kb (up-spc) 的片段,而野生型 RN6390 无扩增片段;而采用引物 primer7、primer8 在野生型 RN6390 扩增出约 0.5 kb 的 *hmp* 基因的

部分相应片段,在 RN6390 Δ hmp 无扩增片段(图 2-A)。这些结果初步说明突变株 RN6390 Δ hmp 中 *hmp* 基因已经被 *spc* 抗性基因替代而缺失。基因组 DNA 中相应片段扩增和序列测定结果进一步证明了 *hmp* 基因缺失突变株基因组中 *hmp* 基因已被 *spc* 基因所替换。

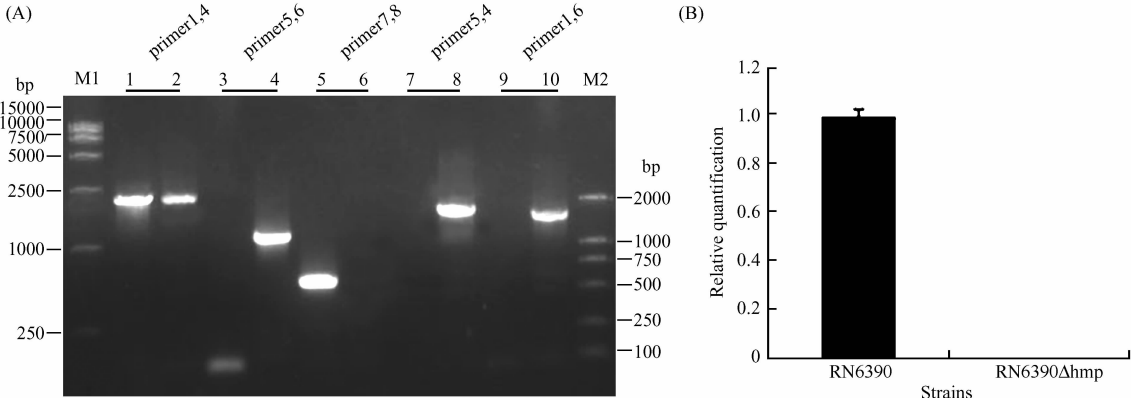


图 2 缺失菌株 RN6390 Δ hmp 的 PCR 和荧光实时定量 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of the mutant RN6390 Δ hmp by PCR and real-time PCR. A: PCR. M1. DNA marker (15000); M2. DNA marker(2000); 1,3, 5,7,9. RN6390 chromosome; 2,4,6,8,10. RN6390 Δ hmp chromosome. B: The expression of *hmp* gene in RN6390 and RN6390 Δ hmp.

2.2.3 荧光定量 PCR 检测 *hmp* 基因在 mRNA 水平上的表达:利用荧光定量 PCR 对野生型和突变菌株中 *hmp* 基因的表达进行了分析。如图 2-B 所示,野生株 RN6390 中 *hmp* 基因的 mRNA 表达正常,而突变株 RN6390 Δ hmp 中 *hmp* 基因的 mRNA 的表达几乎为 0,以上结果都说明该突变菌株已构建成功。

2.3 *hmp* 基因在金黄色葡萄球菌抵抗硝化压力中的作用

定量 PCR 结果显示, *hmp* 基因表达受到外源 NO 的诱导作用,外源添加 500 μ mol/L NO 供体, *hmp* 基因的表达提高了 1 倍多(图 3- A)。无论是野生型和缺失突变株对 NO 耐受性均随着 NO 供体 SNP 浓度的提高而降低,而 *hmp* 基因缺失突变体的 NO 耐受性显著低于野生型(图 3-B),说明 HMP 蛋白能够降低 NO 对金黄色葡萄球菌的毒性。

2.4 *hmp* 基因在金黄色葡萄球菌生物被膜形成中的作用

细菌生物被膜是由细菌及其分泌的胞外基质形成的多细胞结构,它是细菌产生抗生素耐药和逃避机体免疫系统攻击的重要原因之一^[17]。实验结果如图 4 所示,静态生物被膜模型条件下, *hmp* 基因缺

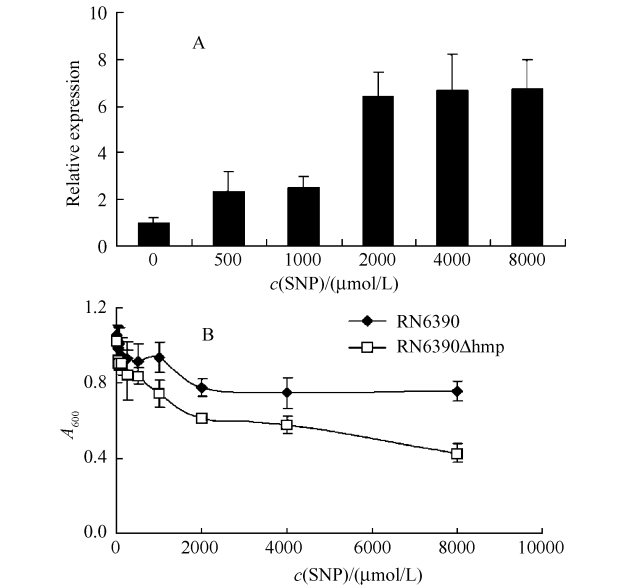


图 3 SNP 对 RN6390 的 *hmp* 基因表达的影响和 *hmp* 基因缺失突变株对外源 NO 耐受力检测

Fig. 3 The effect of SNP on the expression of *hmp* gene of RN6390 (A) ($p < 0.01$) and the sensitivity of RN6390 Δ hmp to SNP (B). Results are the average of six replicates + SD at least three independent experiments.

失突变株生物被膜形成能力明显增加,其形成的生物被膜的量提高了约 23%。

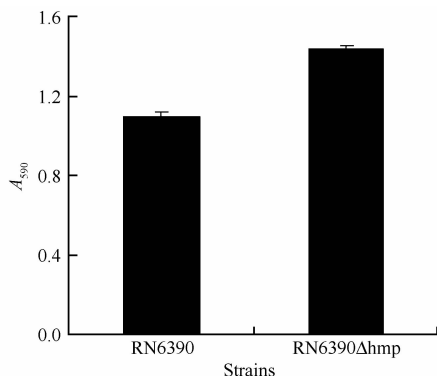


图4 金黄色葡萄球菌 RN6390 及其 *hmp* 基因缺失突变株生物被膜形成检测

Fig. 4 Biofilm formation of *S. aureus* RN6390 and RN6390 Δ hmp.

Results are the average of six replicates + SD at least three independent experiments. ($p < 0.05$).

3 讨论

在实验中我们发现导致金黄色葡萄球菌转化效率降低的因素除了致密的胞壁肽聚糖层^[13],还包括在生长过程中产生大量的细胞间质多糖粘附素 PIA/PNAG(主要是 β -1,6-N-乙酰氨基葡聚糖)。2003 年, Kaplan 等人首次发现了一种能够通过降解这一葡聚糖的内切酶, β -1,6-N-乙酰氨基葡聚糖降解酶(DspB)^[18]。本实验室也分离得到了一种 DspB, 而且我们发现在菌体生长过程中加入此酶能够降解 PIA/PNAG, 由此而制备的感受态细胞转化率会明显提高(结果未显示)。DspB 和溶葡萄球菌酶的联合使用为我们成功构建 RN6390 的 *hmp* 基因缺失突变株创造了很好的条件。

HMP 蛋白是很多细菌中关键和有效的 NO 解毒剂, 它能负责大部分 NO 消耗。在有氧条件下 HMP 蛋白能够将 NO 硝酸化, 在厌氧条件下可以还原 NO 为 N_2O 。近年来对于微生物 HMP 蛋白的功能及具体调控机制的研究逐渐增多。Poole 等人的研究表明 *Escherichia coli* 的 *hmp* 基因缺失突变株较野生型对 NO 的敏感性显著增强^[19]。此外, 在 *Bacillus subtilis* 中, NO 能够通过双组分调控系统 ResDE(respiration) 诱导特定基因的转录, 使 *hmp* 基因表达^[20]。本研究结果表明金黄色葡萄球菌中的 *hmp* 基因的表达明显得受到硝化压力的诱导, 同时, *hmp* 基因缺失突变体的 NO 耐受性也显著低于野生型, 说明金黄色葡萄球菌中 HMP 蛋白具有与大肠杆菌相似的抗硝化作用, 这与 Fang 等人的报道是一致

的^[5]。

研究表明在细菌感染宿主的过程中, 宿主可以感知细菌并通过调节免疫系统清除细菌, 同样细菌也可以感知来自环境或宿主的压力, 当外界环境不利时细菌会降低自身毒力因子的产生或形成生物被膜等逃避宿主免疫系统的攻击^[21-22]。我们检测了 *hmp* 基因缺失突变株生物被膜形成能力, 发现 *hmp* 基因缺失后金黄色葡萄球菌的生物被膜形成能力增强, 推测可能 *hmp* 基因缺失后细菌应对环境硝化压力的能力降低因而更容易形成具有保护作用的生物被膜, 此外我们在前期研究中还发现生物被膜内部细菌的 NOS 表达上调, 而外源添加 NO 后细菌的生物被膜形成能力是增强的(结果未显示), 说明 NO 可以调节金黄色葡萄球菌的生物被膜形成, 而 *hmp* 基因缺失可以间接引起细胞内的 NO 浓度升高, 而引起生物被膜形成的增加。本实验对金黄色葡萄球菌 RN6390 的 *hmp* 基因缺失突变体的成功构建为我们进一步研究此基因及内源性 NO 在金黄色葡萄球菌中的生物学功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(3):1008-1015.
- [2] Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB Journal*, 1992, 6(12): 3051-3064.
- [3] Spiro S. Nitric oxide-sensing mechanisms in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions*, 2006, 34(Pt 1): 200-202.
- [4] Fang F. Perspectives series; host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *The Journal of Clinical Investigation*, 1997, 99(12): 2818-2825.
- [5] Richardson A, Dunman P, Fang F. The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(4):927-939.
- [6] Richardson A, Libby S, Fang F. A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science*, 2008, 319(5870):1672-1676.

- [7] Frey AD, Kallio PT. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(4):525-545.
- [8] Andrews S, Shipley D, Keen J, Findlay J, Harrison P, Guest J. The haemoglobin-like protein (HMP) of *Escherichia coli* has ferrisiderophore reductase activity and its C-terminal domain shares homology with ferredoxin NADP + reductases. *FEBS Letters*, 1992, 302(3):247-252.
- [9] Anjum M, Ioannidis N, Poole R. Response of the NAD(P)H-oxidising flavohaemoglobin (Hmp) to prolonged oxidative stress and implications for its physiological role in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 166(2):219-223.
- [10] Kim SO, Orii Y, Lloyd D, Hughes MN, Poole RK. Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Letters*, 1999, 445(2-3):389-394.
- [11] Bird L, Ren J, Zhang J, Foxwell N, Hawkins A, Charles I, Stammers D. Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *Staphylococcus aureus*. *Structure*, 2002, 10(12):1687-1696.
- [12] LeBlanc DJ, Lee LN, Inamine JM. Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1991, 35(9):1804-1810.
- [13] Arnaud M, Chastanet A, Debarbouille M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(11):6887-6891.
- [14] Schenk S, Laddaga RA. Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 73(1-2):133-138.
- [15] 高慧,路新枝,于文功.金黄色葡萄球菌一氧化氮合酶基因(*nos*)缺失突变株的构建.现代生物医学进展(*Progress In Modern Biomedicine*), 2008, 8(10):1845-1848.
- [16] Shanks RM, Donegan NP, Graber ML, Buckingham SE, Zegans ME, Cheung AL, O'Toole GA. Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Infection and Immunity*, 2005, 73(8):4596-4606.
- [17] Fux C, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Costerton J. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2003, 1(4):667-683.
- [18] Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N, Fine DH. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *The Journal of Bacteriology*, 2003, 185(16):4693-4698.
- [19] Stevanin T, Ioannidis N, Mills C, Kim S, Hughes M, Poole R. Flavohemoglobin Hmp affords inducible protection for *Escherichia coli* respiration, catalyzed by cytochromes bo or bd, from nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(46):35868-35875.
- [20] Nakano M. Induction of ResDE-dependent gene expression in *Bacillus subtilis* in response to nitric oxide and nitrosative stress. *The Journal of Bacteriology*, 2002, 184(6):1783-1787.
- [21] Elson G, Dunn-Siegrist I, Daubeuf B, Pugin J. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Blood*, 2007, 109(4):1574-1583.
- [22] Wu L, Estrada O, Zaborina O, Bains M, Shen L, Kohler JE, Patel N, Musch MW, Chang EB, Fu YX, Jacobs MA, Nishimura MI, Hancock RE, Turner JR, Alverdy JC. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, 2005, 309(5735):774-777.

Construction of *Staphylococcus aureus* RN6390 *hmp* gene mutant and analysis of NO sensitivity

Peng Jiang, Xinzhi Lu, Fangjie Hou, Zhanjun Liu, Wengong Yu *

Key Laboratory of Marine Drugs, Chinese Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: [**Object**] To investigate the function of flavohaemoglobin (HMP) in *Staphylococcus aureus* RN6390 under the nitrification pressure, we constructed the *hmp* gene deletion mutant of RN6390 strain. [**Methods**] According to principle of homologous recombination, we obtained the up stream and down stream sequences of *hmp* gene by PCR using chromosomal DNA of *S. aureus* RN6390 as template. Antibiotics pressure and alternating temperature culture were applied for mutant strain selection. We verified the clones screened out by genome PCR and real-time PCR quantification. Sodium nitroprusside (SNP), as nitric oxide (NO) donor, was used for NO resistance evaluation. In addition, we compared the bacteria biofilm formation ability of *hmp* gene mutant strain with wild type. [**Results**] We successfully constructed *hmp* gene mutant strain of *S. aureus* RN6390. The expression of *hmp* gene was direct correlate with the concentration of exogenous NO. We found that compared to wild type, the mutant strain was more sensitive to NO and it is prone to form bacteria biofilm. [**Conclusions**] The successfully constructed *hmp* gene deletion mutant of *S. aureus* provided the possibilities to further investigate the biological function of *hmp* gene in the resistance of *S. aureus* to NO from host immune system.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Flavohaemoglobin (HMP), homologous recombination, biofilm

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA09Z418, 2007AA091506)

* Corresponding author. Tel: +86-532-82031680; E-mail: yuwg66@ouc.edu.cn

Received: 14 September 2010/Revised: 22 November 2010

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,5-7个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给出作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。