



耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MRSA252 辅酶 A 二硫化物还原酶缺失延缓苯唑西林的次级损伤效应

杨萍^{1,2}, 刘蔷², 蒋宇³, 孙兵兵³, 杨俊杰³, 李琦⁴, 杨晟^{3*}, 陈代杰^{5*}

¹复旦大学药学院, 上海 201203

²上海医药工业研究院, 上海 201203

³中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032

⁴四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610101

⁵上海交通大学药学院, 上海 200240

摘要:【目的】耐甲氧西林金黄色葡萄球菌在苯唑西林作用下, 其辅酶 A 二硫化物还原酶表达上调 2.3 倍。本文研究苯唑西林对该酶缺失的金黄色葡萄球菌的杀菌效应。【方法】利用同源重组双交换技术对金黄色葡萄球菌进行基因敲除, 并用质粒 pOS1 构建回补株; 采用分光光度法检测菌株体外增殖能力; 以时间-杀菌法考察苯唑西林对菌株杀菌效应; 以 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐为探针检测胞内活性氧水平。【结果】辅酶 A 二硫化物还原酶基因敲除株较亲株生长缓慢($P<0.05$); 20 倍 MIC 浓度苯唑西林下敲除株的时间-杀菌曲线及胞内活性氧水平与亲株无显著性差异, 5 倍 MIC 浓度下敲除株的致死速率及胞内活性氧水平均较亲株下降。【结论】在较低浓度苯唑西林作用下, 辅酶 A 二硫化物还原酶基因缺失降低胞内活性氧水平, 减小杀菌速率, 延缓次级损伤效应。

关键词: 金黄色葡萄球菌, 基因编辑, 辅酶 A 二硫化物还原酶, 活性氧, 次级损伤

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 是引起临床皮肤或软组织感染的常见菌株, 其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 的检出率高达 35% 以上^[1]。在 2017 年, 世界卫生组织列出的世界上最威胁人类健康的“超级细菌”中, 耐甲氧西林金

黄色葡萄球菌被归为“高度耐药性”菌株。目前, 临床用于治疗金葡菌感染的首选药物依旧是 β -内酰胺抗生素。 β -内酰胺抗生素是一种杀菌性药物, 对其作用机制的研究经历了“微生物形态学——生物化学(细胞壁结构)——分子生物学”过程^[2], 但这些机制研究还未成功探索到新的药物作用靶

基金项目: 国家自然科学基金(81573329, 81872775, 21825804); 上海市自然科学基金(18ZR1446800, 18ZR1446500)

*通信作者。E-mail: 陈代杰, hccb001@163.com; 杨晟, syang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2019-01-03; 修回日期: 2019-05-05; 网络出版日期: 2019-06-03

点, 因此, 我们怀疑已知的 β -内酰胺抗生素杀菌机制依旧不够完善。前期我们对苯唑西林作用下 MRSA 菌株中蛋白组学进行了研究^[2-4], 比较 1.0 h 和 0.5 h 蛋白组学变化, 其中辅酶 A 二硫化物还原酶(coenzyme A disulfide reductase, CoADR)均有不同程度上调(2.3 倍和 2.0 倍)。猜测 CoADR 可能参与了 β -内酰胺类抗生素杀菌过程。

CoADR 由 *cdr* 编码, 属于吡啶核苷酸-二硫化物氧化还原酶超家族^[5], 作为小分子二硫化物还原酶在 NADPH 辅酶作用下可以将 1 分子辅酶 A 二硫化物还原成 2 分子辅酶 A 硫醇和 1 分子 NADP⁺^[5-6], 即维持小分子硫醇 CoASH 的还原状态。Eggers 等及 Boylan 等^[7-8]在伯氏疏螺旋体菌中发现 *cdr* 参与细菌的氧化应激反应, 该基因的敲除能够增强细菌对叔丁基-氢过氧化物的敏感性, 且辅酶 A 在体外对过氧化氢具有还原作用等。有研究^[9]表明杀菌性抗生素通过诱导产生羟基自由基引起氧化应激, 从而实现杀菌作用。因此, 研究者^[9]将抗生素杀菌作用总结为两种形式: 一是初级损伤, 由抗生素作用导致的直接损伤; 二是次级损伤, 是细菌对初级损伤应答比如氧化应激反应等引起的损伤。我们猜测 CoADR 可能通过影响氧化应激反应的次级损伤来参与 β -内酰胺类抗生素杀菌过程。

对基因的功能研究需要依靠基因组编辑技术。目前已报道用于金黄色葡萄球菌基因组编辑工具有两种, 一种是基于 CRISPR-Cas 的编辑技术^[10-11], 一种是传统的同源重组双交换技术^[12]。本研究前期比较了这两种技术在 MRSA 菌株中的编辑效果, 发现 CRISPR-Cas 系统在 MRSA 菌株敲除效果不理想, 本研究利用同源重组双交换技术获得 *cdr* 基因敲除菌株。Luba 等^[13]通过体外比较野生型和氨基酸 43 位突变型的 CoADR 的功能,

已证明 CoADR 43 位唯一的半胱氨酸是其活性位点; 同时 *cdr* 基因开放阅读框架对应下游序列基因在 GenBank 数据显示为多拷贝, 本实验综合考虑 *cdr* 基因功能及其上下游序列, 敲除了 MRSA252 菌株 *cdr* 基因从起始密码子 ATG 开始的 301 bp 片段, 实现破坏 CoADR 的功能。我们研究了 *cdr* 敲除株与亲株的生长状态及在苯唑西林杀菌作用下的表型差异, 从而研究苯唑西林对 CoADR 缺失的金黄色葡萄球菌杀菌效应。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、噬菌体和质粒: 金黄色葡萄球菌 MRSA252 菌株和 RN4220 菌株、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购于诺唯赞生物科技有限公司; pKOR1 质粒^[12]、pOS1-*hprk* 质粒和噬菌体 Φ 85 由上海市仁济医院检验科李敏研究员提供。

1.1.2 主要试剂和培养基: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小抽试剂盒、胶回收试剂盒购于美国 Axygene 公司; *Taq* DNA 聚合酶和限制性内切酶购于 MBI 公司; KOD FX DNA 聚合酶购于日本 TOYOBO 公司; 氯霉素购于 MP Biomedicals 公司; 氨苄青霉素和溶菌酶购于 AMRESCO 公司; 苯唑西林购于上海先锋药业公司; 溶葡萄球菌素、T4 DNA 聚合酶购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 活性氧检测试剂盒购于碧云天生物技术公司。

酵母粉、胰蛋白胨、胰蛋白胨大豆肉汤(Trypticase Soy Broth, TSB)培养基和脑心浸液肉汤(Brain Heart Infusion, BHI)培养基购自美国 Oxoid 公司; 琼脂粉购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 牛肉浸膏购于浙江医药新昌制药厂;

可溶性淀粉、NaCl 购于国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器: PCR 仪、电转仪为美国 BioRad 生产; 凝胶电泳仪、凝胶成像仪购于 UVP 公司; 恒温摇床、恒温培养箱购于上海智诚分析仪器制造有限公司; 离心机购于 Eppendorf 公司; 核酸测定仪、紫外分光光度计由美国 BECKMAN 公司生产。

1.1.4 PCR 引物: 引物的序列如表 1。

1.2 质粒构建

根据 NCBI 上 MRSA252 基因组序列设计 *cdr* (从起始密码子 ATG 开始 301 bp) 上下游引物 (*cdrUPF/cdrUPR* 和 *cdrDNF/cdrDNR*), 利用 PCR 方法获得上下游序列, 并连接获得 *cdr* 同源臂片段, 以 PKOR-LIC-F/PKOR-LIC-R 引物扩增 pKOR1 骨架片段, 用 T4 DNA 聚合酶对割胶回收后的骨架和同源臂片段进行处理, 再用 T4 连接酶连接处理后的片段^[14], 用 PKOR-F/PKOR-R 验证, 获得敲除质粒 pKOR1*cdr*。

以 MRSA252 基因组为模板、*cdr-SmaIF/cdr-BamHIR* 为引物 PCR 获得 *cdr* 基因完整开放阅读框(1317 bp)片段, 用 *Sma I/BamH I* 限制性内切酶处理 pOS1 质粒及 *cdr* 片段, 再跑胶回收, 用 T4 连接酶连接回收后的载体和片段, 用 POS1-F/POS1-R PCR 验证, 获得回补质粒 pOS1*cdr*。

1.3 *cdr* 敲除株与回补株构建

将 pKOR1*cdr*、pOS1*cdr* 质粒电击转入金黄色葡萄球菌 RN4220 中, 再将验证正确的 RN4220 转化子(PKOR-F/PKOR-R 或 POS1-F/POS1-R), 直接噬菌体 $\Phi 85$ 转化^[15]至目标菌株 MRSA252、MRSA252- Δ *cdr*, 涂布于含氯霉素 TSA 平板筛选, 再进行 PCR 验证(PKOR-F/PKOR-R 或 POS1-F/POS1-R), 获得 MRSA252(pKOR1*cdr*)菌株及回补株 MRSA252- Δ *cdr*(pOS1*cdr*)。将 MRSA252(pKOR1*cdr*)菌株在含氯霉素的 TSB 中 43 °C 孵育传代 3 次, 再将 10⁻⁴ 稀释的过夜孵育菌液涂布于含 1 mg/mL 的脱水四环素 TSA 平板 30 °C 孵育 2 d, 将单菌落分别接种于含氯霉素和无抗生素 TSA 平板上,

表 1. PCR 引物序列

Table 1. The sequences of primers

Primer names	Primer sequences (5'→3') ^a
PKOR-LIC-F	ATTGGAAGTGGATAACGGTACCGGTTCCGAGGCTC
PKOR-LIC-R	ATTGGATTGGAAGTACGGCCCCGAGCTTAAGACTGG
<i>cdrUPF</i>	TACTTCCAATCCAATGGATTAAATCTTTAGGGTGGC
<i>cdrUPR</i>	ACAATAGGAGGTAAGTTACGAATTTGAAGAATCATACGATAAAC
<i>cdrDNF</i>	ATCGTATGATTCTTCAAATTCGTAACCTACCTCCTATTGT
<i>cdrDNR</i>	TTATCCACTTCCAATGAATGCCTCTTCCATCCATAT
PKOR-F	CACACAGGAAACAGCTATGAC
PKOR-R	GAACCGACTTCTCCTTTTTTCG
<i>cdrVF</i>	GTATGGAATCTCCCGCTTATCT
<i>cdrVR</i>	GTCATATCAACTGTACATACGCC
<i>cdr-SmaIF</i>	GAG <u>CCCCGGG</u> ATGCCCAAATAGTCGTAGT
<i>cdr-BamHIR</i>	GAGGGATCCTTATTTAGCTTTGTAACCAATC
POS1-F	AACTGAAGAACAACGTAACGGC
POS1-R	CACACAGGAAACAGCTATGACC

^a Incorporated restriction sites are underlined.

37 °C 孵育过夜, 再将只在无抗板上长出的单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 获得成功敲除的菌株 MRSA252- Δcdr 。

1.4 体外增殖能力比较

挑单菌落至 BHI 中培养过夜, 第 2 天将菌液 1:100 接入含 25 mL BHI 培养基的 250 mL 摇瓶中, 在 0、2、4、6、8、10、12、16、24 h 时间点吸取 1 mL 菌液利用分光光度计测定其 OD_{600} , 4 h 时间点及之后均稀释 10 倍再测定。过夜孵育菌液梯度稀释(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7}), 分别吸取 5 μ L 至固体平板, 放置 37 °C 培养箱, 孵育 16 h 拍照。

1.5 最小抑菌浓度及时间-杀菌曲线测定

参照美国临床和实验室标准化协会发布的微生物药敏实验检测方法^[16]测定最低抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。挑单菌落过夜孵育, 第 2 天将菌液 1:1000 稀释至 MH (Mueller Hinton) 培养基中, 用于 MIC 测定实验。在 96 孔板分别加入 100 μ L 的 MH 培养基, 加入梯度稀释的苯唑西林抗生素, 最后加入 100 μ L 前面稀释好的菌液(苯唑西林最终浓度梯度为 1024、512、256、128、64、32 μ g/mL)。放入恒温培养箱中培养 16–18 h, 观察细菌的生长情况, 以无细菌生长的最低浓度为 MIC 值。

挑单菌落过夜孵育, 第 2 天 1:1000 接至 2 mL BHI 试管中, 并分别加入 4 个浓度梯度的苯唑西林钠(终浓度 512、2560、5120、10240 μ g/mL), 此时记为 0 时刻, 再分别在 0、4、8、12、24 h 取 100 μ L 菌液, 并用无菌生理盐水梯度稀释成合适浓度, 取 100 μ L 涂布于无抗平板, 37 °C 孵育过夜, 第 3 天记录菌落形成单位(colony-forming units, CFU); 以时间为横轴, 以 $\log(\text{CFU/mL})$ 为纵轴, 绘制时间-杀菌曲线。

1.6 细菌胞内活性氧测定

采用碧云天公司的活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒, 结合说明书和文献[17]调整操作如下。将过夜孵育菌液, 1:100 接至含 150 mL BHI 培养基 750 mL 摇瓶中, 37 °C、220 r/min 孵育 2.5–3.0 h 至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 均分至 5 个无菌 250 mL 摇瓶中, 其中 4 组分别加入不同浓度的药物(苯唑西林终浓度为 512、2560、5120、10240 μ g/mL), 一组不加药; 继续于 37 °C、220 r/min 培养 14 h; 然后 5000 r/min 离心 10 min 收集菌液, 用预冷的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 2 次后重悬, 利用紫外分光光度计调整至 OD_{600} 一致; 再以 1 μ L:1 mL 的比例装载 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐[2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA (10 mmol/L)]探针, 37 °C 孵育 30 min, 5000 r/min 离心 10 min; 再用预冷的 PBS 洗涤重悬 2 次, 洗去未进入的探针; 样品加入 96 孔板, 每个样品设置 3 个复孔, 使用荧光酶标仪测定样品的荧光值(488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长), 实验重复 1 次。

1.7 数据分析

本文均采用 Graphpad Prism 5.0 统计软件进行统计分析, 实验各结果间比较均采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果和分析

2.1 *cdr* 基因敲除株构建

将 pKOR1*cdr* 电转入感受态 RN42200 菌株, 长出 10^2 以上个转化子, 挑取 15 个转化子经鉴定均含有目标质粒, 再通过噬菌体感染法转入 MRSA252 菌株, 获得 2 个含 pKOR1*cdr* 的

MRSA252 菌株, 在 43 °C 氯霉素孵育条件下, 只有一株菌株长浓, 1 mg/mL 脱水四环素诱导长出 40 个单菌落。利用 PCR 筛选敲除株, 如图 1 所示, *cdr* 基因部分敲除株 PCR 片段长度为 1.4 kb, 而野生株(wild type, WT)片段长度约为 1.7 kb, 挑取 31 个鉴定, 16 个为阳性, 敲除率为 51.6%; 表明 *cdr* 基因部分敲除菌株构建成功。

2.2 *cdr* 基因回补株构建

为进一步验证 *cdr* 基因功能, 我们构建了 *cdr* 基因回补株。我们将构建好的含有 *cdr* 完整开放阅读框的 pOS1-*cdr*, 电转入 RN4220 菌株, 再通过噬菌体感染法转入 MRSA252- Δ *cdr* 菌株, 获得 PCR 验证正确菌株。验证结果如图 2 所示, 表明 *cdr* 基因回补株构建成功。



图 1. MRSA252- Δ *cdr* 基因敲除株构建

Figure 1. The construction of MRSA252- Δ *cdr* mutant strain. M: DNA marker; 1–31: PCR amplification product of 31 single colonies of MRSA252 (pKOR1*cdr*) randomly selected; WT: PCR amplification product of MRSA252 wild strain.

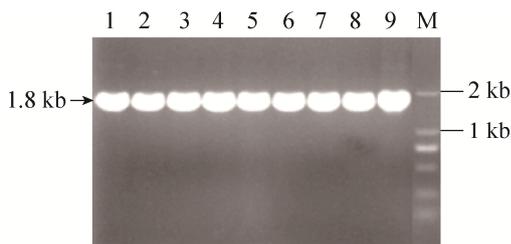


图 2. *cdr* 基因回补株 MRSA252- Δ *cdr*(pOS1*cdr*)的构建
Figure 2. The construction of *cdr* complementation strains MRSA252- Δ *cdr*(pOS1*cdr*). M: DNA marker; lane 1–9: PCR amplification product of 9 single colonies of MRSA252- Δ *cdr* (pOS1*cdr*) randomly selected.

2.3 *cdr* 基因敲除对菌株体外增殖能力影响

在 37 °C, 液体培养和固体平板培养 *cdr* 敲除株、回补株与亲株, 结果如图所示(图 3), 与 MRSA252 亲株相比, MRSA252 *cdr* 基因部分敲除株在液体培养中生长速率低于野生株, 且在相同孵育时间下平板孵育的菌落也小于野生菌; 同时从生长曲线及菌落大小看, 回补株 MRSA252- Δ *cdr* (pOS1*cdr*) 恢复其生长速率, 表明 CoADR 缺失使菌株生长缓慢, 但不致死。

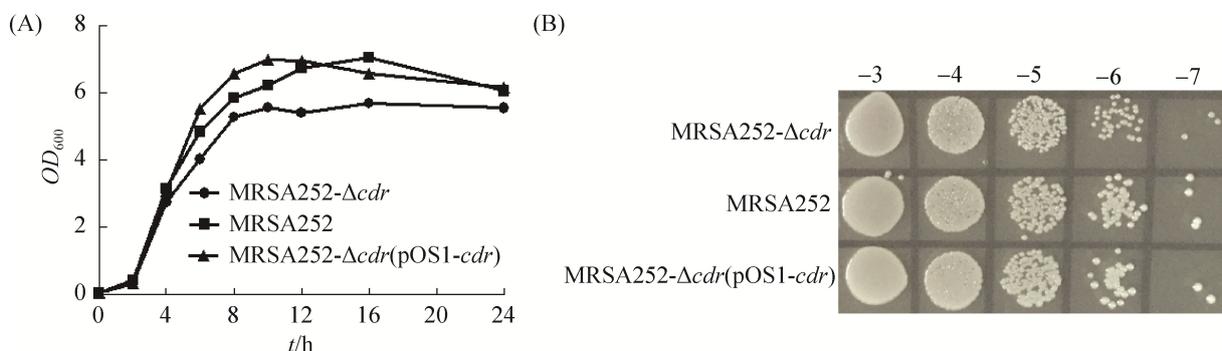


图 3. 菌株 MRSA252- Δ *cdr*、MRSA252- Δ *cdr*(pOS1*cdr*)与 MRSA252 的生长比较

Figure 3. Comparison of the growth of strains MRSA252- Δ *cdr*, MRSA252- Δ *cdr*(pOS1*cdr*) and MRSA252.

2.4 苯唑西林作用于 *cdr* 基因敲除株、回补株与亲株的 MIC 及时间-杀菌曲线

为研究苯唑西林对 CoADR 缺失金黄色葡萄球菌的杀菌效应, 我们测定了苯唑西林对 *cdr* 基因敲除菌株、回补株与亲株的 MIC 及时间-杀菌曲线。MIC 测定结果, *cdr* 基因敲除株、回补株与野生株一致, 均是 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 表明 CoADR 缺失不影响苯唑西林的对 MRSA 的抑菌活性。基于 MIC, 我们绘制了不同浓度苯唑西林作用的时间-杀菌曲线, 如图 4 所示, 在 1 倍 MIC 苯唑西林作用下, *cdr* 敲除株较亲株略耐药, 差异较小; 在 5 倍 MIC 苯唑西林作用下, 两者差异增大, *cdr* 敲除株杀菌速率较亲株低, 之后随着苯唑西林浓度增大(10 倍 MIC、20 倍 MIC), *cdr* 敲除株与野生株之间差异

又减小; 且 *cdr* 回补株菌落数在 5 倍 MIC 苯唑西林作用下表现出较快的下降。结果说明苯唑西林作用时, 20 倍 MIC 浓度下 *cdr* 敲除株的时间-杀菌曲线无显著性差异, 而 5 倍 MIC 浓度下 CoADR 缺失菌株的致死速率显著下降。

2.5 *cdr* 基因敲除对在高浓度苯唑西林胁迫下胞内活性氧产生的影响

为验证 CoADR 是否参与了次级损伤中的氧化应激反应, 我们采用 DCFH-DA 探针标记检测不同浓度苯唑西林作用后 MRSA 252、*cdr* 敲除株及回补株胞内 ROS 水平。结果如图 5 所示, 与时间杀菌曲线的趋势一致, 亲株与敲除株胞内 ROS 差异先增大后减小; 且在 5 倍 MIC 苯唑西林作用下, 胞内 ROS 水平最大, *cdr* 敲除株胞内 ROS 水

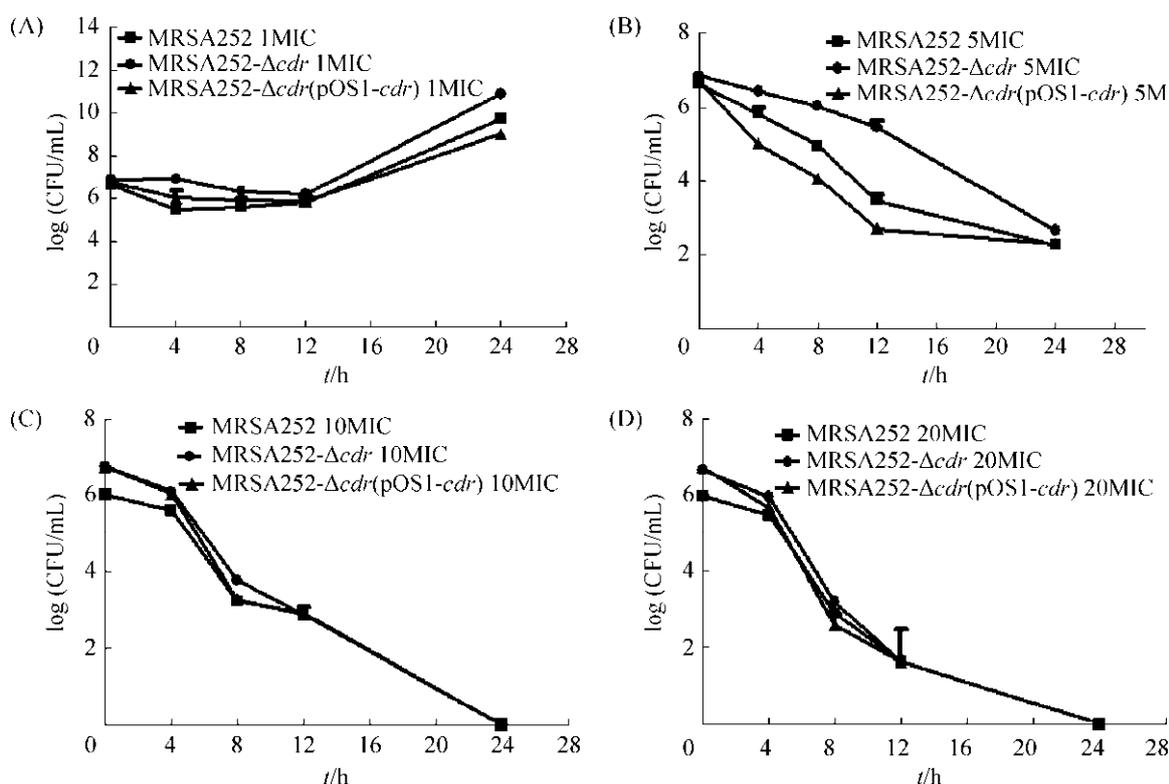


图 4. 不同浓度苯唑西林作用 MRSA252- Δcdr 、MRSA252- Δcdr (pOS1*cdr*)与 MRSA252 时间-杀菌曲线
 Figure 4. Time-kill curves of MRSA252- Δcdr , MRSA252- Δcdr (pOS1*cdr*) and MRSA252 in the presence of various concentrations of oxacillin.

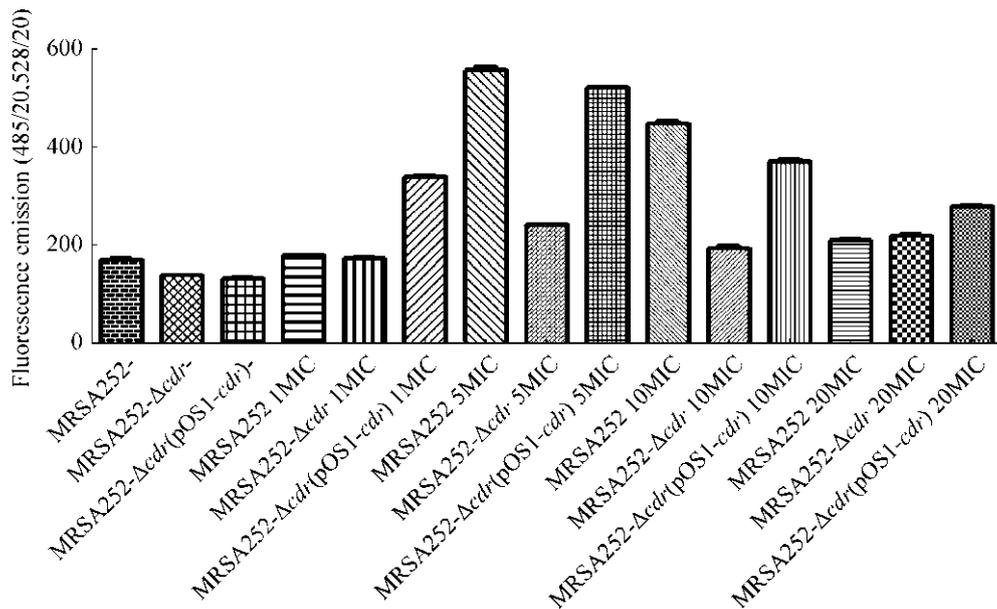


图 5. 不同浓度苯唑西林作用后胞内 ROS 水平

Figure 5. Intracellular ROS levels of the MRSA strains after the action of oxacillin at different concentrations.

平显著低于亲株及回补株，差异最大。结果表明 CoADR 缺失不影响 20 倍 MIC 苯唑西林作用时的胞内 ROS 水平，但显著影响 5 倍 MIC 苯唑西林作用时的 ROS 水平。

3 讨论

本研究以临床分离的 MRSA252 为研究对象，通过传统同源重组双交换敲除方法获得 *cdr* 基因敲除并用质粒 pOS1 对敲除株进行回补，来研究 *cdr* 基因在苯唑西林杀死金黄色葡萄球菌过程中的作用。*cdr* 基因功能研究早有一些报道，其中金黄色葡萄球菌中 CoADR 的体外纯化^[7]为之后其体外合成及结构功能分析研究奠定基础^[5-6,13,18]。Schneider 等^[19]通过差异荧光诱导 NCTC8325 *cdr* 基因突变，发现 *cdr* 基因突变将减弱菌株肾脓肿感染效力 30 倍以上。此外，在伯氏疏螺旋体菌 *Borrelia burgdorferi* 中^[8]，*cdr* 基因缺失将减弱菌株快速生长能力及感染宿主的能力。有研究^[20]根

据基因特征设计的 CoADR 的抑制剂能够抑制金黄色葡萄球菌 RN4220 生长。体外增殖实验与已有研究报道结果一致，显示 CoADR 酶缺失能显著抑制 MRSA252 菌株生长，说明 CoADR 可能在细菌的快速生长中存在一定作用。辅酶 A 二硫化物还原酶维持小分子硫醇辅酶 A 还原态，小分子硫醇在大多数生物尤其是需氧生物中是重要的氧化还原缓冲剂，保护细胞免受环境或胞内的活性化合物带来的损伤，如 ROS、活性氮、金属和抗生素等^[6]。CoADR/CoA 体系在许多细菌中被发现，能保护细菌硫醇蛋白不被氧化^[21]，在维持细菌硫醇-二硫化物的稳态中有一定作用^[8]；同时 CoADR 酶缺失破坏了 CoASSCoA/CoASH 稳态。因此，我们猜测细菌通过反馈抑制生长维持胞内还原态，从而 CoADR 酶缺失表现为菌株快速生长抑制现象。有文献表明^[22]，在金黄色葡萄球菌中，小分子硫醇除了辅酶 A 还存在芽胞杆菌硫醇(Bacillithiol, BSH)和半胱氨酸；在生理 pH=7.7 条件下，辅酶 A

的活性硫代产物含量较少只有 0.7%，且辅酶 A 的 pKa 为 9.83 较 BSH (pKa=7.97) 的高，较难解离；表明在生理条件下，氧化应激反应时消除 ROS 及其引起的氧化损伤的小分子硫醇并不是辅酶 A 而是 BSH。因此，CoADR 酶是否通过影响氧化应激反应参与了苯唑西林杀菌过程是未知的。我们通过 MIC、时间-杀菌曲线及胞内 ROS 水平来表征苯唑西林作用 *cdr* 敲除株与亲株的杀菌效应，结果表明 *cdr* 基因缺失不影响苯唑西林对 MRSA 的生长抑制作用，也并未使其 ROS 水平上升，敏感性增大，反而有所下降，证明了在 MRSA252 菌株中，辅酶 A 小分子硫醇在中和氧化应激产生的 ROS 作用较弱。

细菌致死过程中胞内 ROS 水平与细菌的代谢水平相关，当其代谢水平明显减弱时，我们主要考虑是初级损伤，此时胞内 ROS 水平没有明显变化或甚至减小；当其代谢水平较高时，胞内 ROS 水平将会增大^[23]。我们结果显示，在 5 倍 MIC 苯唑西林作用时，胞内 ROS 水平最高，20 倍 MIC 浓度时胞内 ROS 水平偏低；说明 20 倍 MIC 浓度下，杀菌作用主要考虑是初级损伤；而 5 倍 MIC 浓度下，主要考虑是次级损伤作用。考虑到在 5 倍 MIC 苯唑西林作用下，*cdr* 敲除株与野生株时间-杀菌曲线及胞内 ROS 水平差异均是最大，证明了 CoADR 中断对初级损伤影响较小，但对次级损伤具有显著的延缓作用。在 5 倍 MIC 苯唑西林作用下，CoADR 缺失株的胞内 ROS 水平较亲株有所下降，可能与 CoADR 缺失使细菌生长缓慢相关。

本研究利用传统同源重组双交换敲除技术获得 *cdr* 敲除 MRSA 菌株并以 pOS1 质粒形式获得回补株 MRSA252- Δcdr (pOS1*cdr*)，为我们之后进一步研究耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 CoADR 或研究其他蛋白功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Hu FP, Guo Y, Zhu DM, Wang F, Jiang XF, Xu YC, Zhang XJ, Zhang ZX, Ji P, Xie Y, Kang M, Wang CQ, Wang AM, Xu YH, Shen JL, Sun ZY, Chen ZJ, Ni YX, Sun JY, Chu YZ, Tian SF, Hu ZD, Li J, Yu YS, Lin J, Shan B, Du Y, Guo SF, Wei LH, Zou FM, Zhang H, Wang C, Hu YJ, Ai XM, Zhuo C, Su DH, Wang RZ, Fang H, Yu BX, Zhao Y, Gong P, Guo DW, Zhao JY, Liu WE, Li YM, Jin Y, Shao CH, Wen KZ, Zhang YR, Xu XS, Yan C, Yu H, Huang XN, Wang SM, Chu YF, Zhang LX, Ma J, Zhou SP, Zhou Y, Zhu L, Meng JH, Dong F, Zheng HY, Shen H, Zhou WQ, Jia W, Li G, Wu JS, Lu YM. Antimicrobial resistance profile of clinical isolates in hospitals across China: report from the CHINET Surveillance Program, 2017. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2017, 18(3): 241–251. (in Chinese)
胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 康梅, 王传清, 王爱敏, 徐元宏, 沈继录, 孙自镛, 陈中举, 倪语星, 孙景勇, 褚云卓, 田素飞, 胡志东, 李金, 俞云松, 林洁, 单斌, 杜艳, 郭素芳, 魏莲花, 邹凤梅, 张泓, 王春, 胡云建, 艾效曼, 卓超, 苏丹虹, 汪瑞忠, 房华, 俞碧霞, 赵勇, 龚萍, 郭大文, 赵金英, 刘文恩, 李艳明, 金炎, 邵春红, 温开镇, 张贻荣, 徐雪松, 鄢超, 喻华, 黄湘宁, 王山梅, 楚亚菲, 张利侠, 马娟, 周树平, 周艳, 朱镭, 孟晋华, 董芳, 郑红艳, 沈瀚, 周万青, 贾伟, 李刚, 吴劲松, 卢月梅. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 241–251.
- [2] Zhang T, Ni MX, Shao L, Chen DJ. Research progress in mechanism of β -lactam antibiotics *Chinese Journal of Antibiotics*, 2015, 40(10): 785–790. (in Chinese)
张韬, 倪孟祥, 邵雷, 陈代杰. β -内酰胺抗生素作用机制的研究进展. 中国抗生素杂志, 2015, 40(10): 785–790.
- [3] Liu XF, Hu YW, Pai PJ, Chen DJ, Lam H. Label-free quantitative proteomics analysis of antibiotic response in *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13(3): 1223–1233.
- [4] Liu XF, Pai PJ, Zhang WP, Hu YW, Dong XJ, Qian PY, Chen DJ, Lam H. Proteomic response of methicillin-resistant *S. aureus* to a synergistic antibacterial drug combination: a novel erythromycin derivative and oxacillin. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19841.
- [5] delCardayré SB, Davies JE. *Staphylococcus aureus* coenzyme a disulfide reductase, a new subfamily of pyridine

- nucleotide-disulfide oxidoreductase: sequence, expression, and analysis of *cdr*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(10): 5752–5757.
- [6] delCardayré SB, Stock KP, Newton GL, Fahey RC, Davies JE. Coenzyme A disulfide reductase, the primary low molecular weight disulfide reductase from *Staphylococcus aureus*: purification and characterization of the native enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(10): 5744–5751.
- [7] Boylan JA, Hummel CS, Benoit S, Garcia-Lara J, Treglown-Downey J, Crane III EJ, Gherardini FC. *Borrelia burgdorferi* bb0728 encodes a coenzyme A disulphide reductase whose function suggests a role in intracellular redox and the oxidative stress response. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(2): 475–486.
- [8] Eggers CH, Caimano MJ, Malizia RA, Kariu T, Cusack B, Desrosiers DC, Hazlett KRO, Claiborne A, Pal U, Radolf JD. The coenzyme A disulphide reductase of *Borrelia burgdorferi* is important for rapid growth throughout the enzootic cycle and essential for infection of the mammalian host. *Molecular Microbiology*, 2011, 82(3): 679–697.
- [9] Zhao XL, Drlica K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 21: 1–6.
- [10] Liu Q, Jiang Y, Shao L, Yang P, Sun BB, Yang S, Chen DJ. CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Staphylococcus aureus*. *Acta Biochimica et Biophysica SINICA*, 2017, 49(9): 764–770.
- [11] Chen WZ, Zhang YF, Yeo WS, Bae T, Ji QJ. Rapid and efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(10): 3790–3795.
- [12] Bae T, Schneewind O. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. *Plasmid*, 2006, 55(1): 58–63.
- [13] Luba J, Charrier V, Claiborne A. Coenzyme A-disulfide reductase from *Staphylococcus aureus*: evidence for asymmetric behavior on interaction with pyridine nucleotides. *Biochemistry*, 1999, 38(9): 2725–2737.
- [14] Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nature Methods*, 2007, 4(3): 251–256.
- [15] Olson ME. Bacteriophage transduction in *Staphylococcus aureus*//Bose J. The Genetic Manipulation of Staphylococci: Methods and Protocols. New York, NY: Humana Press, 2014.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-Ninth Edition (M07-A9). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [17] Li ZL, Tan J, Shao L, Dong XJ, Ye RD, Chen DJ. Selenium-mediated protection in reversing the sensitivity of bacterium to the bactericidal antibiotics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2017, 41: 23–31.
- [18] Mallett TC, Wallen JR, Karplus PA, Sakai H, Tsukihara T, Claiborne A. Structure of Coenzyme A-disulfide reductase from *Staphylococcus aureus* at 1.54 Å resolution. *Biochemistry*, 2006, 45(38): 11278–11289.
- [19] Schneider WP, Ho SK, Christine J, Yao MQ, Marra A, Hromockyj AE. Virulence gene identification by differential fluorescence induction analysis of *Staphylococcus aureus* gene expression during infection-simulating culture. *Infection And Immunity*, 2002, 70(3): 1326–1333.
- [20] van der Westhuyzen R, Strauss E. Michael acceptor-containing coenzyme A analogues as inhibitors of the atypical coenzyme A disulfide reductase from *Staphylococcus aureus*. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(37): 12853–12855.
- [21] Newton GL, Rawat M, La Clair JJ, Jothivasan VK, Budiarto T, Hamilton CJ, Claiborne A, Helmann JD, Fahey RC. Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in *Bacilli*. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(9): 625–627.
- [22] Perera VR, Newton GL, Pogliano K. Bacillithiol: a key protective thiol in *Staphylococcus aureus*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2015, 13(9): 1089–1107.
- [23] Van Acker H, Coenye T. The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(6): 456–466.

Deficiency of coenzyme A disulfide reductase in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA252 delays the secondary damage of oxacillin

Ping Yang^{1,2}, Qiang Liu², Yu Jiang³, Bingbing Sun³, Junjie Yang³, Qi Li⁴, Sheng Yang^{3*}, Daijie Chen^{5*}

¹ School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China

² Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China

³ Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

⁴ College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, Sichuan Province, China

⁵ School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] The expression of coenzyme A disulfide reductase in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was up-regulated by 2.3 folds when the strain was cultured with oxacillin. Here, the bactericidal effect of oxacillin on coenzyme A disulfide reductase deficient *Staphylococcus aureus* was studied. [Methods] Homologous recombination mediated double-exchange techniques were used to delete genes in *Staphylococcus aureus*, whereas pOS1 plasmid was used to construct the complemented strain. Spectrophotometry was used to detect the proliferation ability of the strains *in vitro*. The bactericidal effect of oxacillin on the strains was studied by time-kill method, and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate was used as a probe to detect intracellular reactive oxygen species levels. [Results] Coenzyme A disulfide reductase gene deleted strain grew more slowly than the parental strain ($P < 0.05$). Under the action of oxacillin, the time-kill curve and intracellular reactive oxygen species level of the knockout strains were slightly different from that of the parental strains at 20 times MIC concentration, and the lethal rate and intracellular reactive oxygen species level of coenzyme A disulfide reductase gene deleted strains were lower than that of the parental strains at 5 times MIC concentrations. [Conclusion] At lower concentrations of oxacillin, the deletion of coenzyme A disulfide reductase gene reduced intracellular ROS levels, and the bactericidal rate, meanwhile the secondary damage was delayed.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, gene editing, coenzyme A disulfide reductase, reactive oxygen species, secondary damage

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81573329, 81872775, 21825804) and by the Shanghai Provincial Natural Science Foundation of China (18ZR1446800, 18ZR1446500)

*Corresponding author. E-mail: Daijie Chen, hccb001@163.com; Sheng Yang, syang@sibs.ac.cn

Received: 3 January 2019; Revised: 5 May 2019; Published online: 3 June 2019