

表皮葡萄球菌 SarA 对 *atlE*、*lipA* 和 *zinC* 基因表达调控的研究*

王海蛟 范长胜** 辛及娣 陶菊红 苑兴卉 高山峨 梁国新

(复旦大学生命科学学院微生物学和微生物工程系, 上海 200433)

摘要 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 是一种条件致病菌, SarA (Staphylococcal accessory regulator A) 是该菌中一个全局性调控因子, 它控制着细胞中许多与毒性相关的基因表达. 报道了 SarA 在转录水平直接调控 *atlE*、*lipA* 和 *zinC* 基因的表达. RT-PCR 和 *lacZ* 报告基因的分析结果显示, 在表皮葡萄球菌 ATCC35984 中, SarA 对 *atlE* (自溶酶基因) 表达起负调控作用, 而对 *lipA* (脂肪酶基因) 和 *zinC* (膜相关锌金属蛋白酶基因) 的表达则有正调控作用. 生物信息学分析表明, SarA 控制 *atlE*、*lipA* 和 *zinC* 3 种基因表达可能是通过与被调控基因上游的特定 DNA 序列的结合来实现的, 该 DNA 结合区保守并富含 AT 碱基. 根据已报道的金黄色葡萄球菌中 SarA 的结合位点序列, 利用 Omega 软件分析并推测了 SarA 结合 *atlE*、*lipA* 和 *zinC* 的可能区域. 基于 SarA 是一种多功能的毒素相关调控因子, 结果提示, SarA 能调控众多因子, 可以作为防治表皮葡萄球菌感染的一个药物筛选靶点.

关键词 SarA, 自溶酶基因(*atlE*), 脂肪酶基因(*lipA*), 膜相关锌金属蛋白酶基因(*zinC*), 基因调控, 表皮葡萄球菌
学科分类号 Q93

表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 是重要的条件致病菌^[1]. 近年来, 高分子材料 (如插管、人工心瓣膜、人工关节和人工晶体等) 相关的慢性感染是由能形成生物膜的表皮葡萄球菌引起的一种新型疾病, 表皮葡萄球菌作为存在于健康人皮肤表面的正常菌群并不致病, 但可伴随“异物” (高分子材料如塑料等) 进入人体, 并通过粘附形成生物膜 (Biofilm), 入侵血循环系统而致败血症等^[2,3]. 而包埋在生物膜中的葡萄球菌较之浮游的细菌对抗生素有更大的抵抗力, 使这类慢性感染治疗起来更加困难. 因此, 近年来有关表皮葡萄球菌的基础研究和临床研究受到人们极大的关注^[4~9]. SarA (Staphylococcal accessory regulator A) 是葡萄球菌中一个重要的全局性中心调节蛋白, 由 *sarA* 基因编码, 124 个氨基酸残基组成. 在金黄色葡萄球菌中, 它最早是作为二级毒力调控子 *agr* 的活化因子被发现的, 通过蛋白质和被调控基因调控区域结合的模式进行调节, 并且得到了 SarA 蛋白的结构. 在表皮葡萄球菌中, 我们前期的工作^[10]和 Tormo 等^[11]已经证明, 在表皮葡萄球菌中, SarA 对 *icaADBC* 基因有调控作用, 同时也证明了 *sarA* 基因对于表皮葡

萄球菌抗药性有着重要的作用. Tormo 等^[11] (2005 年) 认为 SarA 也是通过蛋白质结合的模式调控基因表达的. 为深入研究 *sarA* 的调控功能, 我们选择了分别对表皮葡萄球菌生存, 生物膜粘附、感染侵袭和转移有重要作用的自溶酶 (AtlE)^[12], 脂肪酶 (LipA)^[13] 和膜相关锌金属蛋白酶 (ZinC)^[14] 相关基因进行表达调控研究. 本文报道表皮葡萄球菌 ATCC35984 菌株的 SarA 在转录水平上调控这 3 种基因表达的研究结果, 并利用生物信息学手段对 *sarA* 基因及其蛋白质进行了比对分析, 推断表皮葡萄球菌中 SarA 蛋白实现调控功能的方式, 以及可能的结合位点.

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

实验所用菌株和质粒见表 1.

*国家自然科学基金资助项目 (30270018).

** 通讯联系人.

Tel: 021-55664536, Fax: 021-65650149, E-mail: csfan@fudan.edu.cn

收稿日期: 2006-07-13, 接受日期: 2006-10-05

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain / Plasmid	Function / Character	Source
<i>S. epidermidis</i> RP62A(ATCC35984)	Biofilm-positive strain	ATCC
<i>S. epidermidis</i> RP62A(Δ <i>sarA</i>)	Biofilm-negative strain(<i>sarA</i> ⁻)	[10]
<i>E. coli</i> K12	Donor of <i>lacZ</i>	Stock in Microbial Laboratory of Fudan University
<i>E. coli</i> DH5 α	Receptor for cloning	Stock in Microbial Laboratory of Fudan University
<i>E. coli</i> BL21	Expression strain	Stock in Microbial Laboratory of Fudan University
pUCm-T	Use for cloning and expression	Shanghai Sangong Co.
pBluscript SK(pSK ₊)	Cloning vector	Stock in Microbial Laboratory of Fudan University
pUS	pUCm-T- <i>sarA</i>	Microbial Laboratory of Fudan University
pUZ	pUCm-T- <i>lacZ</i>	Microbial Laboratory of Fudan University
pUZS	pUCm-T- <i>lacZ-sarA</i>	Microbial Laboratory of Fudan University
pULZS	pUCm-T-P _{lipA} - <i>lacZ-sarA</i>	Microbial Laboratory of Fudan University
pUZZS	pUCm-T-P _{zinC} - <i>lacZ-sarA</i>	Microbial Laboratory of Fudan University
pUAZS	pUCm-T-P _{atlE} - <i>lacZ-sarA</i>	Microbial Laboratory of Fudan University
pULZ	pUCm-T-P _{lipA} - <i>lacZ</i>	Microbial Laboratory of Fudan University
pUZZ	pUCm-T-P _{zinC} - <i>lacZ</i>	Microbial Laboratory of Fudan University
pUAZ	pUCm-T-P _{atlE} - <i>lacZ</i>	Microbial Laboratory of Fudan University

1.2 酶与化学试剂

T4 DNA 连接酶, DNA 限制性内切酶, 胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司. RT-PCR 试剂盒购自申能博彩公司. 抽提表皮葡萄球菌基因组 DNA 的 Lysostaphin 购自 Sigma 公司. 其余的酶和化学试剂购自 TaKaRa 公司. 实验操作按照各个试剂操作手册进行.

1.3 培养基、缓冲液和菌株生长条件

1.3.1 大肠杆菌培养基和质粒增殖培养基使用 LB(蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, H₂O 1 000 ml, pH 7.2).

1.3.2 葡萄球菌使用胰蛋白酶消化的大豆肉汤培养基(Tryptic Soy Broth, TSB). 固体培养基中添加琼脂 1.5×10⁻² g/ml.

1.3.3 LacZ 活性检测培养基 A: K₂HPO₄ 10.5 g,

KH₂PO₄ 4.5 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, 柠檬酸钠·2H₂O 0.5 g, H₂O 1 L.

1.3.4 检测 LacZ 活性的 Z 缓冲液: 0.06 mol/L Na₂HPO₄·7H₂O, 0.04 mol/L NaH₂PO₄·H₂O, 0.01 mol/L KCl, 0.001 mol/L MgSO₄·7H₂O, 0.05 mol/L β - 巯基乙醇, pH 值为 7.0, 过滤除菌.

1.3.5 培养条件: 大肠杆菌培养温度 37℃, 葡萄球菌 30℃, 液体摇床培养转速 220 r/min.

1.4 SarA 调控功能的检测

1.4.1 表皮葡萄球菌基因组总 RNA 的抽提参照 Takara公司提供的试剂说明手册.

1.4.2 RT-PCR 参照申能博彩公司试剂盒说明操作. *gyrB*是表皮葡萄球菌中的保守基因, 作为 RT-PCR 阳性参比基因. 选取适当大小的基因保守片段设计的引物序列如表 2, 由上海生工生物技术公司合成.

Table 2 Sequences of primers for RT-PCR

Gene		Primer sequence
<i>gyrB</i>	1	5' TTATGGTGCTGGACAGATACA 3'
	2	5' CACCGTGAAGACCGCCAGATA 3'
<i>lipA</i>	1	5' CGGGGATCCGGTGCTAATTGTGAAGACA 3'
	2	5' CGGCCATGGCTTGTTGTGGTTTCTCTTC 3'
<i>atlE</i>	1	5' CGGGGATCCATGGCGAAAAAATCAATTAC 3'
	2	5' CGGCCATGGTTTGCTACAGATTGTGTCT 3'
<i>zinC</i>	1	5' CGGGGATCCGAGGTGTAGAACATGAGCA 3'
	2	5' CGGCCATGGACTGTCTATCTCTTGGAGC 3'

PCR反应条件：94℃变性，72℃延伸，55℃退火，30 个循环 PCR 扩增。

1.5 LacZ 报告基因表达系统的构建

按照 94℃变性，72℃延伸，55℃退火，30 个循环扩增的 PCR 反应条件扩增得到三段基因的调

控序列，各种质粒的基因串联顺序见表 1，引物设计见表 3，pUCm-T 质粒抽提参照上海生工生物技术公司提供的操作手册，其他的 DNA 操作参照文献[12]。

Table 3 Primer sequences for LacZ report system

Gene or Promoter	Region	Primer sequence	Enzyme site
<i>sarA</i>	1	5' ACGCCATGGGAAGGACTATTTCAAAAATCAATG 3'	<i>Nco</i> I
	2	5' ACGGGATCCATTATACTTCATTTCATTAT 3'	<i>Bam</i> H I
<i>lacZ</i>	3	5' GCGGGATCCGCTATGACCATGATTACGG 3'	<i>Bam</i> H I
	4	5' GCGGGTACCTTAATAACGCCATCAAAAATAATTTC 3'	<i>Kpn</i> I
P_{atE}	5	5' CGGGAGCTCTAACATTCTATATACAAACTTAGC 3'	<i>Sac</i> I
	6	5' CGGGGATCCAGCAACCATAGACGGTAA 3'	<i>Bam</i> H I
P_{lipA}	7	5' CGGGAGCTCTAAGTGAACATCGATGTAATATA 3'	<i>Sac</i> I
	8	5' CGGGGATCCAATGGATGATGCACCTACGCT 3'	<i>Bam</i> H I
P_{zinC}	9	5' CGGGAGCTCTAATGTTTGTATTACCGCTA 3'	<i>Sac</i> I
	10	5' CGGGGATCCAGTTACGAGTACACCAAATAC 3'	<i>Bam</i> H I

1.6 LacZ 活性的测定方法

参照文献[15]，在含有 0.4%葡萄糖，1 mg/L 维生素 B1，1 mol/L MgSO₄ 和适当抗生素的 A 培养基中过夜培养细菌。将培养物 1：50 稀释到同样培养基中，培养至 A₆₀₀ 为 0.4，然后放在冰上。

混合 0.1 ml 细菌培养物，0.9 ml Z 缓冲液，2 滴氯仿和 1 滴 0.1% SDS，振荡 10 s，然后平衡至 28℃。

隔 1 min 后，加入 0.2 ml ONPG (O-Nitrophenyl -β-D-galactopyranside，4 g/L 用 A 培养基配制)，出现黄色时加入 0.5 mol/L Na₂CO₃ 0.5 ml 终止反应，记录从加入 ONPG 起到出现黄色为止的时间 *t* (min)，测量反应体系的 A₄₂₀ 和 A₅₅₀。

LacZ 活性 $U_{LacZ} = 1\,000 (A_{420} - 1.75A_{550}) / (0.1\,t \times A_{600})$

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 SarA 在转录水平调控 *atlE*，*zinC* 和 *LipA* 基因表达

RT-PCR 是以 mRNA 为模板反转录成 cDNA 的分析技术，*gyrB* 是编码 DNA 回旋酶的基因，属于表皮葡萄球菌组成型表达基因，用来做 RT-PCR 检测系统的参照物。取同样量的总 RNA，反转录 DNA 后，取同样量作为模板，同时加入检测基因

引物和 *gyrB* 引物进行 PCR 扩增。

检测结果如图 1 所示。与野生菌株 *S.epidermidis* RP62A 相比，*S.epidermidis* RP62A(Δ*sarA*)菌株中的 *atlE* 表达上升，*zinC* 表达下降，*lipA* 不表达，这表明 SarA 对 *atlE*，*zinC* 和 *lipA* 基因的转录有明显影响，对于 *atlE* 是负调控(抑制表达)，对于 *zinC* 和 *lipA* 是正调控(促进表达)。

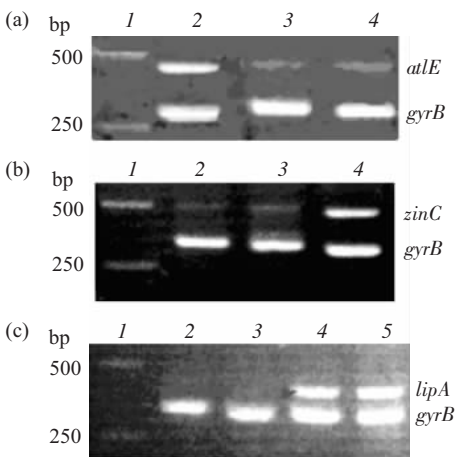


Fig. 1 RT-PCR detection of *atlE* (a) , *zinC* (b) and *lipA* (c) transcription in *S.epidermidis*
(a) 1: DNA marker DL2000; 2: *S.epidermidis* RP62A(Δ*sarA*); 3,4: *S.epidermidis* RP62A. (b) 1: DNA marker DL2000; 2,3: *S.epidermidis* RP62A(Δ*sarA*); 4: *S.epidermidis* RP62A. (c) 1: DNA marker DL2000; 2,3: *S.epidermidis* RP62A(Δ*sarA*); 4,5: *S.epidermidis* RP62A.

2.2 *lacZ* 报告基因证实 *SarA* 直接调控 *atlE*, *zinC* 和 *lipA* 基因转录

为了验证 *SarA* 对 *lipA*, *atlE* 和 *zinC* 的调控是否直接结合于启动区并调控表达, 我们在 pUCm-T 基础上, 设计并构建了一系列重组质粒, 获得 9 种重组质粒, 如图 2 所示. 图 2 中 pULZS, pUAZS, pUZZS 3 种是将 *lacZ* 基因分别置于 *lipA*,

atlE 和 *zinC* 启动子片段下游, *lacZ* 基因后接终止密码子, 其后是 T7 启动子序列, *sarA* 开放阅读框(功能结构基因)插入 T7 启动子序列的下游. pULZ, pUAZ 和 pUZZ 3 种则没有 *sarA* 开放阅读框(对比实验组). pUS, pUZ 和 pUZS 则是将 *sarA* 基因, *lacZ* 基因分别或者同时串连在 pUCm-T 质粒上(本底实验对照组).

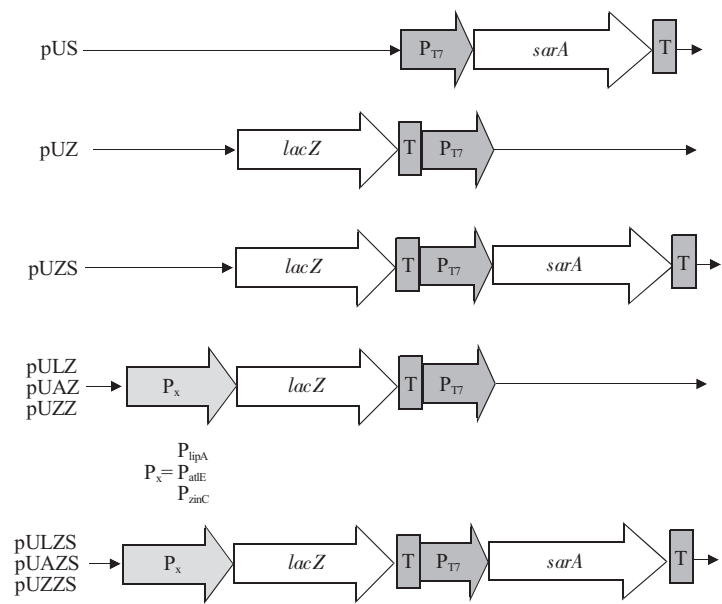


Fig. 2 Construction of the recombinant plasmids for *lacZ* reporter, only the sections relevant to expression are shown

将上述重组质粒分别转入大肠杆菌 BL21 中, 根据 LacZ 活性测定方法, 测得经 IPTG 诱导、含有重组质粒的 BL21 菌株的 LacZ 活性, 测定结果平均值列于表 4. 其中 *E.coli* BL1, *E.coli* BL2, *E.coli* BL3 作为基础对照组, *E.coli* BL4 与 *E.coli* BL5, *E.coli* BL6 与 *E.coli* BL7, *E.coli* BL8 和

E.coli BL9 是两两对应的试验组. 在这组报告基因表达系统中, *lacZ* 表达主要受 P_x 的控制, *sarA* 表达主要受 P_{T7} 的控制, *sarA* 的表达蛋白可以直接与 P_x 的 DNA 序列结合从而控制 P_x 的功能. 因此, 利用 LacZ 酶活性可判断 *sarA* 基因对于 *lipA*, *atlE* 和 *zinC* 的调控作用.

Table 4 Functional assay of *SarA* regulation with reporter gene *lacZ*

Strain / Plasmid	Content	LacZ enzyme activity	
		Enzyme activity/U	Relative activity
<i>E.coli</i> BL1/pUS	<i>sarA</i>	14.4±1.2	1.0
<i>E.coli</i> BL2/pUZ	<i>lacZ</i>	16.6±0.9	1.2
<i>E.coli</i> BL3/pUZS	<i>lacZ-sarA</i>	13.6±1.3	1.0
<i>E.coli</i> BL4/pULZ	P _{lipA} - <i>lacZ</i>	172.8±5.6	12.4
<i>E.coli</i> BL5/pULZS	P _{lipA} - <i>lacZ-sarA</i>	813.9±4.8	58.6
<i>E.coli</i> BL6/pUZZ	P _{zinC} - <i>lacZ</i>	181.6±6.2	13.1
<i>E.coli</i> BL7/pUZZS	P _{zinC} - <i>lacZ-sarA</i>	566.0±3.4	40.7
<i>E.coli</i> BL8/pUAZ	P _{atlE} - <i>lacZ</i>	193.8±5.3	13.9
<i>E.coli</i> BL9/pUAZS	P _{atlE} - <i>lacZ-sarA</i>	99.7±5.7	7.2

表 4 中 LacZ 酶活性数据说明:

a. *zinC*, *lipA* 和 *atlE* 的基因调控区置于 *lacZ* 基因之前, 对于 *lacZ* 基因的表达均有一定的促进作用. 与对照菌株相比, 它们的相对酶活性分别提高 12.4, 13.1 和 13.9 倍. 这些结果表明我们构建的 *lacZ* 报告基因表达系统是有效的.

b. SarA 对于 *lipA* 和 *zinC* 转录表达是正调控. 重组质粒上串联 *sarA* 结构基因之后, LacZ 酶活性显著上升, 分别比对照菌株(*E.coli* BL0/pUCm-T) 提高 58.6 和 40.7 倍; 与不串联 *sarA* 的相应菌株(*E.coli* BL4/pULZ, *E.coli* BL6/pULZZ)比较, 也分别提高 3.1 倍和 4.7 倍. 这些结果意味着 SarA 可以成倍地提高 *lipA* 和 *zinC* 基因表达水平. 在表达系统中, 虽然 SarA 有可能受 *lacZ* 上游调控序列的影响, 但是它的表达主要受 T7 控制, SarA 属于 DNA 结合调控蛋白, 只需少量表达就足以达到调控目的, 因此上述结果是可信的.

c. SarA 对于 *atlE* 转录表达是负调控. *atlE* 基因调控区串联在 *lacZ* 之前, 对 *lacZ* 表达有一定程度的促进作用, 其相对酶活性为 13.9 (*E.coli* BL8/pUAZ). 但是, 在重组质粒上串联 *sarA* 结构基

因之后, LacZ 相对酶活性 (*E.coli* BL9/pUAZS) 为 7.2, 下降了 50%. 这一结果说明 SarA 对 *atlE* 基因表达具有明显抑制作用.

2.3 SarA 蛋白与被调控基因序列的结合位点分析

上述 *lacZ* 报告基因系统的检测数据表明, 葡萄球菌 RP62A 中 *sarA* 基因表达产物(SarA 蛋白)可以直接作用于 *atlE*, *zinC* 和 *lipA* 的基因上游的调控区, 这就意味着 *sarA* 基因能够直接调控表皮葡萄球菌自溶酶(*AtlE*), 脂肪酶(*LipA*)和膜相关锌金属蛋白酶(*ZinC*)的基因表达.

Sterba 等^[16]利用 SELEX 技术分析了金黄色葡萄球菌 SarA 结合的保守序列, 在 56 个克隆中 SarA 结合热点有 7 个碱基(ATTTTAT), 它们的保守性很高, 分别是 A_{73%}T_{89%}T_{80%}T_{86%}T_{95%}A_{91%}T_{89%}. 根据 SarA 蛋白同源性和结构模型一致性比对分析, 参考已有文献资料^[10,16~18], 利用 Omega 2.0 软件, 我们对 LacZ 报告基因系统中已克隆得到的表皮葡萄球菌 P_{atlE}, P_{zinC} 和 P_{lipA} 的序列进行分析, 发现, 在起始密码子上游可以找到类似 ATTTTAT(允许一个碱基的差别)的序列. 在图 3 中, 我们标出了类似序列, 可能的结合区域应包括上述序列.

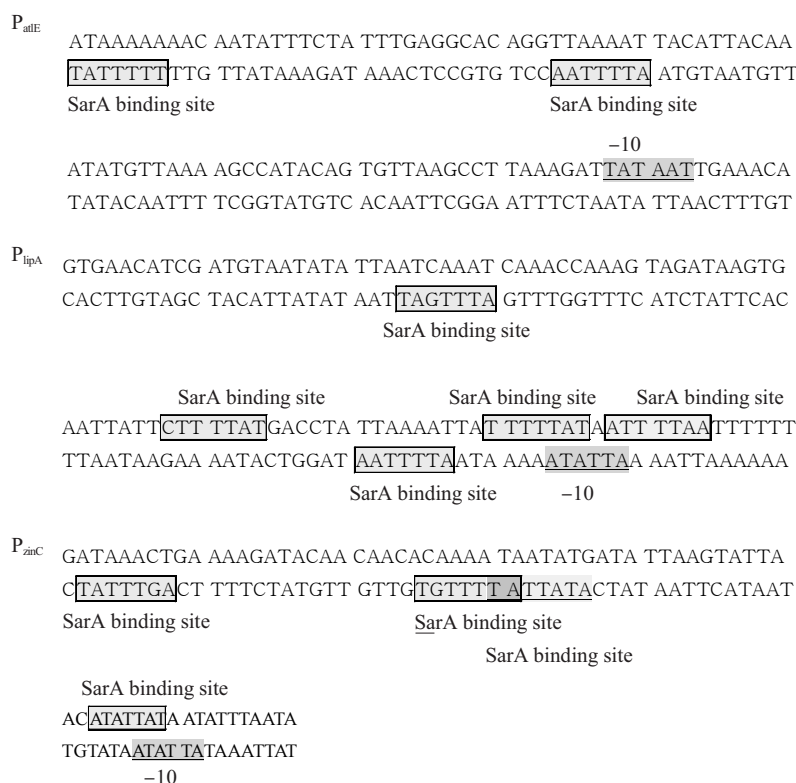


Fig. 3 Putative SarA binding sites in *atlE*, *lipA* and *zinC* promoter regions of *S.epidermidis* RP62A (ATCC35984)

通过对 3 个基因调控序列的分析, 我们认为可能的结合位点存在于图 3 中的区域, 它们包含与已报道^[16,17]的葡萄球菌 *SarA* 蛋白结合保守区域类似的 7 碱基. 我们通过 Clustal X 软件将 *S.epidermidis* RP62A 的 *SarA* 蛋白与 8 种金黄色葡萄球菌的 *SarA* 蛋白比较, 发现同源率为 86%, 这可能是高度一致的原因.

这 3 个基因的调控位点中共同存在类似 ATTTTAT 保守区域, 提示我们, *S. epidermidis* RP62A 的 *SarA* 蛋白可能通过和含有 ATTTTAT 保守碱基的区域的结合来实现对相关基因调控, 这一发现可以指导我们寻找更多的受 *sarA* 调控基因, 对于表皮葡萄球菌 *SarA* 调控机理研究具有相当重要的参考价值.

3 讨 论

葡萄球菌对 β 内酰胺类抗生素耐药机制有多种, 其中一种机制是对 β - 内酰胺抗生素杀菌效应产生耐受性, 表现为细菌虽不对 β 内酰胺抗生素耐药, 但仍然不被杀死, 其原因可能与其缺乏自溶酶有关^[9]. 同时, 生物膜形成的后期粘附阶段的直接粘附方式, 可由荚膜脂多糖 / 粘附素(PS/A)、葡萄球菌自溶酶 E(*AtlE*)、脂质 S(*lipid S*)、葡萄球菌表面蛋白 1 和 2(SSP-1, SSP-2)等因子^[5]介导. 在表皮葡萄球菌生物膜形成中, *ica* 操纵子至关重要, 它直接影响了 PIA 的形成. 在对表皮葡萄球菌 RP62A *ica* 操纵子的研究过程中, 我们发现, 在紧挨着 *ica* 操纵子的位置, 有一个脂肪酶基因 *geh*, 通过比对我们发现, 它和 Farrell 等^[20]1993 年报道的 *S. epidermidis* strain 9 脂肪酶基因具有很高的同源性, 因此在 RP62A 中脂肪酶可能参与了生物膜的形成过程, 并且发挥了比较重要的作用.

而膜相关锌金属蛋白酶属于基质金属蛋白酶家族 (matrix metallo- proteinases, MMPs), 是一簇 Zn^{2+} 依赖性蛋白酶, 其主要功能是降解细胞外基质成分, 在生理及病理过程中发挥着重要作用, 如胚胎发育、创伤修复、血管再生、结缔组织病、牙周病及肿瘤的浸润和转移过程等.

综合上述 RT-PCR 结果和 *lacZ* 报告基因系统测定数据, 结合我们前期工作^[10,18]和已有的文献报道^[11], 可以利用图 4 来阐述 *sarA* 在表皮葡萄球菌中的部分调控功能. 如图 4 所示, *sarA* 基因通过对 *icaADBC* 操纵子, 脂肪酶基因(*lipA*), 自溶酶基因(*atlE*)和膜相关锌金属蛋白酶基因(*zinC*)表达调控,

从而调控生物膜的形成、细菌的生存和自溶以及感染和转移. 由此可知, *sarA* 基因对于表皮葡萄球菌的致病性作用十分重要, 若控制了 *sarA* 表达就可能减少表皮葡萄球菌感染. 因此, 我们认为 *sarA* 可以作为防治表皮葡萄球菌感染的一个药物筛选靶点.

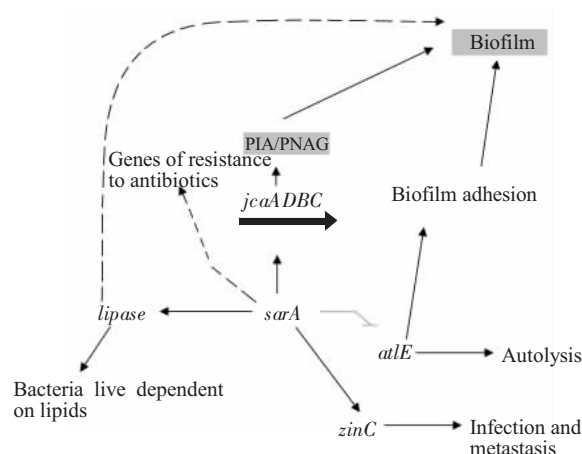


Fig. 4 The regulation of *sarA* in *S. epidermidis* RP62A

—: Inhibition; —→: Activation; - - -: Unknown.

致谢 本论文的写作得到复旦大学丁晓明博士的热情帮助与指导, 特此致谢.

参 考 文 献

- 1 Rupp M E, Archer G L. Coagulase negative *staphylococci*: pathogens associated with medical progress, Clin Infect Dis, 1994, **19** (2): 231~243
- 2 Mack D, Fischer W, Krokotsch A, et al. The intercellular adhesin 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
- 3 McKenney D, Pouliot K L, Wang Y, et al. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an *in vivo*-expressed antigen. Science, 1999, **284** (5419): 1523~1527
- 4 Chien Y, Manna A C, Projan S J, et al. SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for *sar*-dependent gene regulation. J Biol Chem, 1999, **274** (52): 37169~37176
- 5 Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol, 1996, **20** (5): 1083~1091
- 6 Frebourg N B, Lefebvre S, Baert S, et al. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *S.epidermidis* strains. J Clin Microbiol, 2000, **38**: 877~880
- 7 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
- 8 Cramton S E, Gerke C, Schnell N F, *et al.* The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect Immun, 1999, **67** (10): 5427~5433
 - 9 Conlon K M, Humphreys H, O'Gara J P. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. J Bacteriology, 2002, **184** (16): 4400~4408
 - 10 梁国新, 范长胜, 王海蛟, 等. 表皮葡萄球菌调控蛋白 SarA 的表达与特性研究. 复旦学报(自然科学版), 2005, **44** (6): 1042~1046
Liang G X, Fan C S, Wang H J, *et al.* Journal of Fudan University (Natural Science), 2005, **44** (6): 1042~1046
 - 11 Tormo M A, Marti M, Valle J, *et al.* SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis*. J Bacteriology, 2005, **187** (7): 2348~2356
 - 12 Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 26~30, 96~99
 - 13 Heilmann C, Hussain M, Peters G, *et al.* Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. Molecular Microbiology, 1997, **24** (5): 1013~1024
 - 14 Götz F, Verheij H M, Rosenstein R. Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. Chem Phys Lipids, 1998, **93** (1): 15~25
 - 15 魏微, 张微微, 王国强. 基质金属蛋白酶与中枢神经系统疾病. 北京医学, 2001, **23** (4): 239~241
Wei W, Zhang W W, Wang G Q. Beijing Medicine, 2001, **23**(4): 239~241
 - 16 Sterba K M, Mackintosh S G, Blevins J S, *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* SarA binding sites. J Bacteriology, 2003, **185** (15): 4410~4417
 - 17 Schumacher M A, Hurlburt B K, Brennan R G. Crystal structures of SarA, a pleiotropic regulator of virulence genes in *S. aureus*. Nature, 2001, **409** (6817): 215~219
 - 18 Tao J H, Fan C S, Gao S E, *et al.* Depression of biofilm formation and antibiotic resistance by *sarA* disruption in *Staphylococcus epidermidis*. World J Gastroenterology, 2006, **12**(25): 4009~4013
 - 19 Raad I, Alrahwan A, Rolston K. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. Clin Infect Dis, 1998, **26** (3): 1182~1187
 - 20 Farrell A M, Foster T J, Holland K T. Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. J Gen Microbiol, 1993, **139** (2): 267~277

Regulation of SarA on *atlE*, *lipA* and *zinC* Gene Expression in *Staphylococcus epidermidis**

WANG Hai-Jiao, FAN Chang-Sheng**, XIN Ji-Di, TAO Ju-Hong,
YUAN Xing-Hui, GAO Shan-E, LIANG Guo-Xin

(Department of Microbiology and Microbial Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract *Staphylococcus epidermidis* is the common pathogen of nosocomial infection. SarA (staphylococcal accessory regulator A) is a global factor regulating expression of most virulence genes in *S. epidermidis*. It is reported that SarA regulates the transcriptions of *lipA* encoding lipase, *zinC* encoding membrane-associated zinc metalloprotease and *atlE* encoding autolysin. SarA exhibiting an up-regulation on *lipA* and *zinC*, and down-regulation on *atlE* were demonstrated by reverse-transcription PCR and reporter gene *lacZ* analysis respectively. The results demonstrate that SarA regulated directly the expressions of *lipA*, *zinC* and *atlE* by protein-DNA binding to the promoter region of AT-rich sequence. The consensus sequence of binding sites in *atlE*, *lipA* and *zinC* promoter regions of *S. epidermidis* RP62A was forecasted by using program Omega 2.0. The results suggest that SarA could be treated as the target in the prevention of *Staphylococcus epidermidis* infection.

Key words SarA, *atlE*, *lipA*, *zinC*, gene regulation, *Staphylococcus epidermidis*

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30270018).

**Corresponding author. Tel: 86-21-55664536, Fax: 86-21-65650149, E-mail: csfan@fudan.edu.cn

Received: July 13, 2006 Accepted: October 5, 2006