

双组分信号转导系统 SrrBA 调控表皮葡萄球菌生长和生物膜形成

朱 涛 ,谷生丽

(皖南医学院 医学寄生虫学教研室 ,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 探讨双组分信号转导系统 SrrBA 在表皮葡萄球菌中的调控作用。方法: 利用同源重组技术构建表皮葡萄球菌 *srrBA* 基因敲除突变株 ,通过检测 OD₆₀₀ 值绘制其有氧生长曲线 ,并观察其厌氧生长状态 ,微量板半定量方法检测其生物膜形成能力。结果: 经 PCR 扩增和测序验证获得了表皮葡萄球菌 *srrBA* 基因敲除突变株(SE 1457-Δ*srrBA*) 。突变株的生长不论是在有氧还是在厌氧条件下均明显滞后于野生株。此外 ,突变株形成生物膜的能力较之野生株也显著下降。结论: 双组分系统 SrrBA 可调控表皮葡萄球菌的生长和生物膜形成。

【关键词】双组分信号转导系统; SrrBA; 表皮葡萄球菌; 生物膜

【中图分类号】R 378 **【文献标识码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2015. 01. 004

Two-component signal transduction system SrrBA to regulate bacterial growth and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*

ZHU Tao ,GU Shengli

Department of Medical Parasitology ,Wannan Medical College ,Wuhu 241002 ,China

【Abstract】Objective: To explore the regulatory role of the two-component signal transduction system SrrBA in *Staphylococcus epidermidis*(*S. epidermidis*) . **Methods:** Homologous recombination technique was used to generate a *srrBA* knockout mutant in *S. epidermidis* 1457 via temperature-sensitive shuttle vector pMAD. Bacterial growth curve was determined by measuring the value of OD₆₀₀ under aerobic condition ,with anaerobic growth being observed. Effect of *srrBA* mutant on the biofilm formation was measured by a semi-quantitative microtiter plate assay. **Results:** The knockout mutant was successfully acquired and verified by PCR amplification and sequencing. The mutant exhibited drastically retarded growth compared to the parent strain under either aerobic or anaerobic conditions. Moreover ,biofilm formation was significantly reduced in the *srrBA* mutant. **Conclusion:** The SrrBA two-component system could regulate bacterial growth and biofilm formation in *S. epidermidis*.

【Key words】two-component signal transduction system; SrrBA; staphylococcus epidermidis; biofilm

基金项目: 皖南医学院博士科研启动基金项目(2011)

收稿日期: 2014-08-04

作者简介: 朱 涛(1983-) ,男 ,讲师 ,博士 (电话) 15155317590 (电子信箱) happyzhtao@ gmail. com.

著升高 ,表明采用皮下多点注射佐剂抗原加高碘法建立小鼠 EAT 模型符合 AIT 的病理损害特征 ,是一种有效的建模方法 ,可以为 AIT 的发病机制和治疗方法的研究提供可靠的动物模型。

【参考文献】

[1] Farine JC. Animal models in autoimmune disease in immunotoxicity assessment[J]. Toxicology ,1997 ,119: 29 - 35.

[2] 郭小楠 ,宋广义 ,封娟毅 ,等. 自身免疫性甲状腺疾病患者血清雌二醇泌乳素检测的临床意义[J]. 实用医机杂志 ,2006 ,13(13) : 2209 - 2211.

[3] 陈忠城 ,李学俊 ,黄建华 ,等. 血清中 TGAb 和 TPOAb 在甲状腺疾病中的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志 ,2011 ,21(11) :

2717 - 2719.

[4] 邬月琴 ,何岚 ,刘萍 ,等. 碘与自身免疫性甲状腺疾病发病的关系[J]. 西安交通大学学报: 医学版 ,2006 ,27(3) : 295 - 297.

[5] 孙葳 ,宋光华 ,贺斌. 碘和甲状腺球蛋白诱导大鼠实验性自身免疫性甲状腺炎的研究[J]. 中华内科杂志 ,2000 ,39(12) : 841 - 842.

[6] Zaccone P ,Fehervari Z ,Blanchard L ,et al. Autoimmune thyroid disease induced by thyroglobulin and lipopolysaccharide is inhibited by soluble TNF receptor type I[J]. Eur J Immunol ,2002 ,32(4) : 1021 - 1028.

[7] 田恩江 ,赵树君 ,孙富军 ,等. 3 种诱导自身免疫性甲状腺炎动物模型的效果比较[J]. 中国地方病学杂志 ,2003 ,22(6) : 488 - 491.

双组分信号转导系统 (two-component signal transduction systems ,TCSs) 是细菌感知和响应外界环境变化最主要的调控系统。TCSs 由细胞膜上的组氨酸激酶 (histidine kinase ,HK) 蛋白和胞质内具有转录因子活性的反应调节蛋白 (response regulator ,RR) 两部分组成 ,其编码基因通常前后串联排列形成操纵子。当有外界信号刺激或配体作用于 HK 的感知结构域时 ,HK 胞内的保守组氨酸残基发生自身磷酸化。随后 ,被激活的 HK 与 RR 的调控区相互作用 ,将磷酸基团转移到 RR 的天冬氨酸残基上。磷酸化使 RR 效应区构象发生改变 ,可结合 DNA 序列以激活或抑制靶基因的转录。研究发现它不仅广泛参与细菌的基本生理活动 ,还与很多病原菌的毒力和致病性密切相关^[1-2]。金黄色葡萄球菌双组分信号转导系统 SrrBA (staphylococcal respiratory response) 响应氧气浓度变化 ,调节毒力因子分泌和呼吸代谢。另外 ,研究表明它在厌氧状态下可激活生物膜相关 *ica* 操纵子的表达 ,促进生物膜形成^[3-4]。表皮葡萄球菌已成为引发院内感染的前五位病原体之一 ,在医用材料表面形成生物膜是其致病最主要的毒力因子^[5]。尽管基因组有着高度同源性 ,但已有研究表明表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌采用不同的机制调控生物膜形成^[6-8]。目前尚未见对表皮葡萄球菌 SrrBA 双组分系统的研究报道。因此 ,本课题拟通过构建 *srrBA* 基因敲除突变株研究 SrrBA 对表皮葡萄球菌生长和生物膜形成的调控作用。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒 表皮葡萄球菌 1457 株、大肠杆

表 1 用于基因敲除突变株构建和验证的 PCR 引物

Tab 1 Primers used in the construction and validation of the *srrBA* knockout mutant

Primers	Sequence(5'→3')	Length (bp)	Restriction
srrUF	CGGGATCCTCATCAGCCATCTTGTTCC	911	BamH I
srrUR	CGGAATTCAACTGTGTGGGGTGTCCG		EcoR I
srrDF	TCCCCGGGCATACCTTTCTACTACCTCCTACA	884	Sma I
srrDR	GAAGATCTGGAGAGTCAAATGAGTAAAGAAC		Bgl II
srrIF	GATGACCATGACAATACCACTTC	1877	
spcIR	CATCTGTGTTATGGCGGCTA		
spcIF	TGGTTCAGCAGTAAATGGTGG	1622	
srrIR	CCTACTACAGAAGAAGATGAAGCA		

1.3.3 葡萄球菌感受态细胞的制备及电转实验
取对数生长早期的 6 mL 菌液 ,6 000 g 室温离心 10

菌 DH5α 和金黄色葡萄球菌 RN 4220 株由本教研室保存 ,穿梭质粒 pMAD-*spc* 由法国巴斯德研究 Débarbouillé 教授惠赠。

1.2 主要试剂和培养基 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA Marker、Pfu DNA 聚合酶购自天根生化科技有限公司;溶葡萄球菌素 (lyso-staphin) 和壮观霉素购自 Sigma 公司;限制性内切酶、DNA 连接酶购自 Fermentas 公司;质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司;LA Taq DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司;红霉素、X-gal、引物合成和测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成;TSB (Tryptic Soy Broth) 为美国 BD 公司产品;B2 培养基成分为:10 g/L 干酪素水解物 25 g/L 酵母提取物 25 g/L 氯化钠 1 g/L 磷酸氢二钾 5 g/L 葡萄糖。

1.3 表皮葡萄球菌 *srrBA* 基因敲除突变株的构建

1.3.1 表皮葡萄球菌基因组 DNA 的提取 取过夜培养的细菌细胞 (至多 2×10^9) ,10 000 g 离心 1 min ,收集菌体 ,加入 2 mg/mL 的溶葡萄球菌素 37 °C 孵育 30 min ,按照基因组提取试剂盒方法进行后续操作。

1.3.2 同源重组质粒的构建 以表皮葡萄球菌基因组 DNA 为模板 ,PCR 扩增目的基因 *srrBA* 上下游的同源片段。其中 ,以 srrUF/srrUR 为引物扩增出 911bp 含 BamH I、EcoR I 酶切位点的上游片段 ,以 srrDF/srrDR 为引物扩增出 884bp 含 Sma I、Bgl II 酶切位点的下游片段。上下游同源片段依次克隆至 pMAD-*spc* 载体抗性筛选基因 *spc* 的两侧 ,得到同源重组质粒 pMAD-Δ*srrBA*。所用引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计 ,具体序列见表 1。

min。无菌超纯水和 10% 甘油分别将菌体洗涤两次后 ,用 80 μL 的 10% 甘油重悬即得一份感受态细

胞,每份约含 10^{10} 个细菌。每份感受态细胞中加入 $10\ \mu\text{g}$ 重组质粒DNA,混合均匀后转移至 $1\ \text{mm}$ 间隙的电击杯中,进行电击(电转条件:电压 $2\ \text{kV}$,电容 $25\ \mu\text{F}$,电阻 $100\ \Omega$)。立即加入 $1\ \text{mL}$ B2培养基,并转移至 $1.5\ \text{mL}$ EP管中, $30\ ^\circ\text{C}$ 振荡培养 $3\ \text{h}$ 。 $2\ 000\ \text{g}$ 室温离心 $5\ \text{min}$ 后弃上清,菌体重悬于适量的B2培养基中,涂布至含 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 红霉素的BM平板上, $30\ ^\circ\text{C}$ 温箱培养 $24\sim 36\ \text{h}$ ^[9]。先将pMAD- $\Delta srrBA$ 电转入金黄色葡萄球菌RN 4220中进行限制性修饰,再把经修饰的重组质粒电转入表皮葡萄球菌1457株。

1.3.4 基因敲除突变株的筛选 pMAD为温度敏感性质粒,当温度 $\geq 40\ ^\circ\text{C}$ 时很易丢失;编码 β 半乳糖苷酶,携带该质粒的葡萄球菌可分解生色底物X-gal致菌落呈现蓝色,而当其从细菌丢失后,菌落则呈现白色。在高温和壮观霉素的压力条件下,质粒pMAD- $srrBA$ 将与表皮葡萄球菌基因组发生两次重组,壮观霉素抗性基因将取代 $srrBA$ 基因,同时质粒也将因复制能力受损而丢失。根据以上原则进行基因敲除突变株的筛选^[10]。取 $3\ \text{mL}$ 含有pMAD- $\Delta srrBA$ 的表皮葡萄球菌菌液接种新鲜 $300\ \text{mL}$ 含 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素的BM培养基, $42\ ^\circ\text{C}$ 振荡培养 $24\ \text{h}$;以下同前,共传代 5 次,每天更换新鲜的含 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素的BM培养基。取少量菌液接种至含 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素, $20\ \text{mg}/\text{mL}$ X-gal的TSB平板;挑取单个白色菌落分别接种至含 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素的和含 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 红霉素的TSB平板,其中壮观霉素平板上生长、红霉素平板上不生长的菌落为初筛重组成功的 $srrBA$ 基因敲除突变株,命名为SE1457- $\Delta srrBA$ 。

1.3.5 基因敲除突变株的鉴定 以初筛所得的突变株基因组DNA为模板,采用LA Taq DNA聚合酶,以引物srrIF/spcIR扩增上游同源片段外侧到 spc 基因的一段序列,以引物spcIF/srrIR扩增 spc 基因到下游同源片段外侧的另一段序列。反应条件为 $94\ ^\circ\text{C}\ 5\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}\ 30\ \text{s}$ $50\ ^\circ\text{C}\ 30\ \text{s}$ $72\ ^\circ\text{C}\ 120\ \text{s}$,共 30 个循环; $72\ ^\circ\text{C}\ 7\ \text{min}$ 。所用引物具体序列见表1。如果在目的基因 $srrBA$ 处同源重组成功则能扩增出预期长度的DNA片段。最后对PCR产物进行凝胶回收并测序验证。

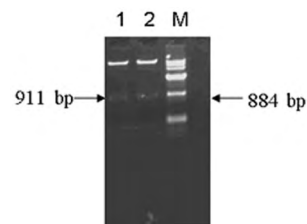
1.4 表皮葡萄球菌有氧生长曲线的测定 将过夜培养的表皮葡萄球菌接种于含 $100\ \text{mL}$ TSB培养基的 $1\ 000\ \text{mL}$ 锥形瓶中,调节接种量,使得 $\text{OD}_{600} = 0.01$,置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、 $220\ \text{rpm}$ 条件下振荡培养,每小时测量一次 OD_{600} 值并绘制生长曲线。

1.5 表皮葡萄球菌厌氧生长状态的观察 将过夜培养的表皮葡萄球菌按 $1:200$ 接种于厌氧培养基($30\ \text{g}/\text{L}$ TSB; $1.0\ \text{g}/\text{L}$ 半胱氨酸盐酸盐; $3\ \text{mg}/\text{L}$ 刃天青钠),覆盖上液体石蜡油, $37\ ^\circ\text{C}$ 静止培养 $24\ \text{h}$,观察培养基的浊度变化。

1.6 生物膜半定量检测 将过夜培养的表皮葡萄球菌以TSB培养基 $1:200$ 稀释,加入96孔培养板($200\ \mu\text{L}/\text{孔}$),每株菌 3 复孔, $37\ ^\circ\text{C}$ 分别静置培养 $12\ \text{h}$ 和 $24\ \text{h}$ 。丢弃菌液,加入PBS($200\ \mu\text{L}/\text{孔}$)洗去未粘附细菌,重复操作 3 次。加入 99% 甲醇($200\ \mu\text{L}/\text{孔}$)固定 $15\ \text{min}$,弃甲醇室温干燥,加入 2% 结晶紫($200\ \mu\text{L}/\text{孔}$)染色 $8\ \text{min}$,自来水冲洗培养板至流水无色,干燥后用酶标仪在 $570\ \text{nm}$ 波长处测量吸光度值。数据统计学分析采用独立样本 t 检验,设突变株为实验组,野生株为对照组, $P < 0.05$ 为有显著差异。

2 结果

2.1 同源重组质粒pMAD- $\Delta srrBA$ 的鉴定 对从大肠杆菌中提取的重组质粒分别经限制性内切酶BamH I、EcoR I和Sma I、Bgl II双酶切,结果得到了 $911\ \text{bp}$ 的上游同源片段和 $884\ \text{bp}$ 的下游同源片段(图1),表明重组质粒pMAD- $\Delta srrBA$ 构建成功。pMAD- $\Delta srrBA$ 依次电转金黄色葡萄球菌RN 4220和表皮葡萄球菌1457株,经提取质粒后酶切鉴定均得到了确认。



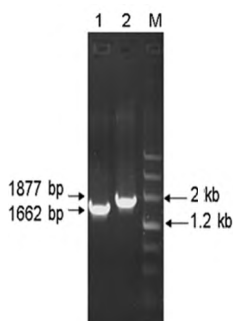
M: D15000 DNA marker; Lane 1: Digested by BamH I and EcoR I; Lane 2: Digested by Sma I and Bgl II

图1 大肠杆菌中重组质粒pMAD- $\Delta srrBA$ 酶切鉴定

Fig 1 Identification of the recombinant plasmid pMAD- $\Delta srrBA$ in *E. coli*

2.2 表皮葡萄球菌 $srrBA$ 基因敲除突变株的筛选与鉴定 在 $42\ ^\circ\text{C}$ 的培养温度和 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素的选择压力下,转化有pMAD- $\Delta srrBA$ 的表皮葡萄球菌总共经过 5 次传代培养,获得了 2 个菌落呈现白色且对壮观霉素耐药、红霉素敏感的疑似突变株。以同源片段外侧基因序列和 spc 基因序列设计的两对引物对筛选出的突变株进行PCR扩增,均获得与预期大小一致的片段,分别为 $1\ 877\ \text{bp}$ 和 $1\ 622\ \text{bp}$

(图2) ,且通过测序证实 ,表明 *srrBA* 基因已经成功被 *spc* 抗性基因片段所替换。



M: Marker III DNA marker; Lane 1: *spc* fragment plus regions downstream of *srrBA*; Lane 2: Regions upstream of *srrBA* plus *spc* fragment

图2 基因组 PCR 鉴定表皮葡萄球菌 *srrBA* 突变株

Fig 2 Confirmation of SE1457-*srrBA* by PCR amplification from genomic DNA

2.3 表皮葡萄球菌 *srrBA* 突变株生长缓慢 对 *srrBA* 突变株和野生株有氧生长曲线测定的结果显示 ,培养 4 h 后 ,突变株 $OD_{600} = 0.248 \pm 0.322$,野生株 $OD_{600} = 1.447 \pm 0.014$ ($n = 3, t = 6.445, P = 0.003$) ;培养 10 h 后 ,突变株 $OD_{600} = 2.593 \pm 0.350$,野生株 $OD_{600} = 8.580 \pm 0.436$ ($n = 3, t = 18.524, P = 0.000$) ;突变株的生长明显比野生株迟缓 ,且突变株无明显的对数生长期(图3) 。对它们在厌氧条件下的生长状态进行进一步观察 ,结果显示经过 24 h 的培养 ,野生株的菌液已比较浑浊 ,而突变株的菌液看上去还很清亮 ,表明 *srrBA* 突变既抑制了表皮葡萄球菌的有氧生长也抑制了其厌氧生长(图4) 。

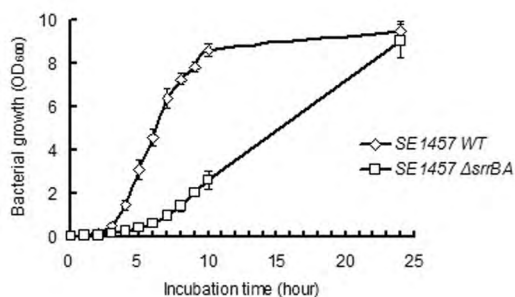


图3 表皮葡萄球菌 *srrBA* 突变株和野生株的有氧生长曲线
Fig 3 Growth curves of SE1457-*srrBA* and its parent strain under aerobic condition

2.4 表皮葡萄球菌 *srrBA* 突变株生物膜形成能力下降 采用微量板半定量法对 *srrBA* 突变株的生物膜形成能力进行检测 ,结果显示 ,培养 12 h 后 ,突变株 $OD_{570} = 0.287 \pm 0.042$,野生株 $OD_{570} = 1.172 \pm 0.111$ ($n = 3, t = 12.903, P = 0.000$) ;培养 24 h 后 ,

突变株 $OD_{570} = 1.117 \pm 0.119$,野生株 $OD_{570} = 2.048 \pm 0.152$ ($n = 3, t = -8.335, P = 0.001$) ;突变株的生物膜形成能力均明显低于野生株(图5) 。

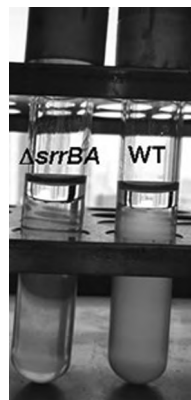
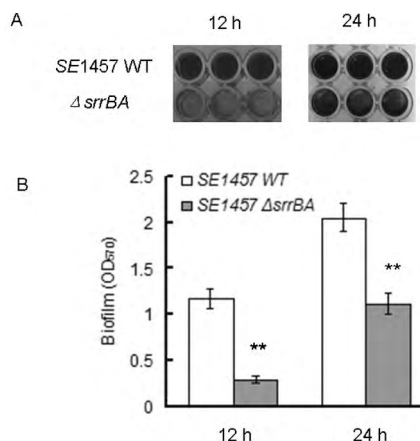


图4 表皮葡萄球菌 *srrBA* 突变株和野生株的厌氧生长状态

Fig 4 Anaerobic growth of SE 1457-*srrBA* and its parent strain



A. *S. epidermidis* biofilm was cultured in 96-well polystyrene plates and stained with crystal violet under aerobic condition; B. Biofilm density was semi-quantified by the value of OD_{570} . One of at least three independent experiments was shown. Data represent mean \pm SD; * * $P < 0.01$ ($\Delta srrBA$ versus WT)

图5 表皮葡萄球菌生物膜的微量板半定量法检测

Fig 5 Detection of *S. epidermidis* biofilm by a semi-quantitative microtiter plate assay

3 讨论

在枯草芽孢杆菌中 ,*SrrBA* 的同源蛋白是双组分信号转导系统 ResDE。枯草芽孢杆菌 ResDE 是其有氧和厌氧代谢重要的整体调控子^[11]。金黄色葡萄球菌 *SrrBA* 根据氧气浓度变化 ,调控 RNA III、TSST-1、蛋白 A 和 PIA 等毒力因子的表达^[3]。而 *SrrBA* 在表皮葡萄球菌中的调控作用仍然未知。本研究基于同源重组的原理 ,利用穿梭质粒 pMAD 成功构建了表皮葡萄球菌 *srrBA* 基因敲除突变株 ,为下一步的功能研究奠定了基础。

表皮葡萄球菌 *srrBA* 突变株有氧生长和厌氧生长都明显滞后于野生株,与枯草芽孢杆菌 *resDE* 突变后的生长状态相符,而与大多数金黄色葡萄球菌 *srrBA* 突变株有氧生长无变化的结果不符。已有研究表明枯草芽孢杆菌中 *ResDE* 既调控氧化呼吸链上的细胞色素氧化酶 *caa3* 和 *aa3*,也调控厌氧调控子 *Fnr*、硝酸盐还原酶 *nasDEF*^[11]。而在金黄色葡萄球菌 *srrBA* 突变株中则主要是参与发酵的关键酶如乙醇脱氢酶和乳酸脱氢酶在有氧和厌氧条件下表达均下调^[12]。因此, *srrBA* 突变导致的有氧生长状态的不同可能是由于不同菌种遗传组成不同所致。*srrBA* 突变株的生物膜形成能力在有氧状态下也显著降低。金黄色葡萄球菌通常只有在厌氧的条件下才会形成生物膜,而表皮葡萄球菌不论是在有氧还是在厌氧条件下均能形成生物膜^[13]。因此,研究金黄色葡萄球菌 *SrrBA* 激活 *ica* 操纵子的实验是在厌氧条件下开展的,而我们的结果则提示了不论是在有氧还是厌氧条件下 *SrrBA* 均可能通过激活 *ica* 操纵子促进生物膜形成。

【参考文献】

[1] Dubrac S, Boneca IG, Poupel O *et al.* New insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of bacteriology* 2007, 189(22) : 8257 – 8269.

[2] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction [J]. *Annual review of biochemistry* 2000, 69: 183 – 215.

[3] Pragman AA, Yarwood JM, Tripp TJ *et al.* Characterization of virulence factor regulation by *SrrAB* a two-component system in *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of bacteriology* 2004, 186(8) : 2430 – 2438.

[4] Ulrich M, Bastian M, Cramton SE *et al.* The staphylococcal respiratory response regulator *SrrAB* induces *ica* gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions [J]. *Molecular microbiology* 2007, 65 (5) : 1276 – 1287.

[5] Otto M. *Staphylococcus epidermidis*—the ‘accidental’ pathogen [J]. *Nature reviews* 2009 7(8) : 555 – 567.

[6] Toledo-Arana A, Merino N, Vergara-Irigaray M *et al.* *Staphylococcus aureus* develops an alternative *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system [J]. *Journal of bacteriology* 2005, 187(15) : 5318 – 5329.

[7] WANG Jixue, ZHU Tao, LOU Qing, *et al.* Biological functions of *arlS* gene of two-component signal transduction system in *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* 2007 27(10) : 946 – 953.

[8] Cotter JJ, O’Gara JP, Mack D *et al.* Oxygen-mediated regulation of biofilm development is controlled by the alternative sigma factor sigma(B) in *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Applied and environmental microbiology* 2009 75(1) : 261 – 264.

[9] Löfblom J, Kronqvist N, Uhlén M *et al.* Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism [J]. *J Appl Microbiol* 2007, 102: 736 – 747.

[10] Arnaud M, Chastanet A, Débarbouillé M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 2004 70(11) : 6887 – 6891.

[11] Sun G, Sharkova E, Chesnut R *et al.* Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of bacteriology*, 1996, 178(5) : 1374 – 1385.

[12] Throup JP, Zappacosta F, Lunsford RD *et al.* The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function [J]. *Biochemistry* 2001 40(34) : 10392 – 10401.

[13] Cramton SE, Ulrich M, Gotz F *et al.* Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Infection and immunity* 2001 69(6) : 4079 – 4085.