

DOI:10.13350/j.cjpb.220208

• 论著 •

不同来源金黄色葡萄球菌的全基因组序列分析*

陈驰, 石继春, 王春娥, 梁丽, 龙新星, 叶强**, 徐颖华**

(中国食品药品检定研究院, 卫健委生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 102629)

【摘要】 目的 了解不同来源金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)的全基因组序列基本特征, 探究菌株的分子分型、耐药基因型、毒力及其遗传进化关系。方法 应用 solexa 高通量测序技术对 10 株医源性和食源性代表株金葡菌进行全基因组测序, 以此进行多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)、金葡菌 a 蛋白(*Staphylococcus aureus* protein A, *spa*) 基因分型分析, 并比较分析不同菌株基因组中携带耐药基因和毒力因子, 筛选核心基因, 构建系统进化树。结果 10 株金葡菌染色体基因组大小相似, 均为 2.7 Mbp, 包含有 2 486~2 648 个基因不等, 平均长度约为 887 bp。耐药基因注释分析显示 9 株甲氧西林敏感金葡菌(MSSA)携带的耐药基因少于另一株耐甲氧西林金葡菌(MRSA)。尽管在不同菌株基因组之间的毒力因子数量无显著区别, 但不同菌株存在的毒力因子却不同, 食品来源金葡菌基因组携带 1~4 种数量不等的肠毒素基因。进化树分析显示不同来源金葡菌位于不同进化分支, 2 株为 ST8 型的 MSSA 和 MRSA 进化亲缘性较高, 属于同一进化分支内。结论 获得 10 株不同来源金葡菌的全基因组序列数据, 并证实食源性或医院来源金葡菌为了适应不同生存环境, 通过不同分子进化机制, 获得不同耐药基因和毒力因子, 形成菌株特定的分子遗传特征, 可为金葡菌的分子流行病学和致病性机制研究提供参考依据。

【关键词】 金黄色葡萄球菌; 不同来源; 全基因组测序; 毒力因子; 耐药基因

【中图分类号】 R378.11

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)02-0165-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Feb;17(2):165-169.]

Whole-genomic sequence analysis of *Staphylococcus aureus* from different sources

CHEN Chi, SHI Ji-chun, WANG Chun-e, LIANG Li, LONG Xin-xing, YE Qiang, XU Ying-hua

(NHC Key Laboratory for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China) ***

【Abstract】 **Objective** To understand the characteristics of whole-genomic sequence of *Staphylococcus aureus* from different sources, and to explore the molecular typing, drug resistance genotype, virulence and genetic evolution of those strains. **Methods** Solexa high-throughput sequencing technology was used to analyze the whole-genome of 10 hospital-derived and food-borne representative *S. aureus* strains. Based on these results, multilocus sequence typing (MLST) and *S. aureus* A protein genotyping were determined, and comparative analysis were performed for drug resistance genes and virulence factors from different strain genomes. A phylogenetic tree was constructed by screening core genes from different genomes. **Results** The results showed that the chromosomal genomes of 10 *S. aureus* were similar in size, all of which were approximate 2.7Mbp, containing 2,486-2,648 genes, and the average length was about 887bp. The drug resistance gene annotation analysis showed that 9 methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) carried less drug resistance genes than that of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Although there were no obvious differences in the number of virulence factors between the genomes of different strains, the virulence factors of different strains were distinct. It was found that the *S. aureus* genome from food sources carried 1-4 types of enterotoxin genes. The phylogenetic tree showed that *S. aureus* from different sources were located in different phylogenetic branches, and the two ST8-type MSSA and MRSA have higher evolutionary relationship and belonged to the same phylogeny. **Conclusion** The whole-genome sequence data of 10 *S. aureus* strains from different sources were obtained. It was suggested that food-borne or hospital-derived *S. aureus* can adapt to different living environments through different molecular evolution mechanisms to obtain different drug resistance gene and virulence factors, which formed the specific molecular genetic characteristics of *S. aureus* strains. These results will provide a reference for subsequent studies on the molecular epidemiology and pathogenic mechanism of *S. aureus*.

【Key words】 *Staphylococcus aureus*; different sources; whole genome sequencing; virulence factor; drug resistance gene

* **【基金项目】** 国家重点研发计划项目(No. 2018YFC1603900); 国家科技基础条件平台-国家菌种资源库(No. NMRC-2021-2)。

** **【通讯作者】** 叶强, E-mail: qiangyee@nifdc.org.cn, 徐颖华, E-mail: xuyh@nifdc.org.cn

【作者简介】 陈驰(1983-), 女, 北京人, 主管技师, 从事医学微生物溯源资源标准化工作, E-mail: chenchiml@sina.com。

金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)为革兰阳性球菌,可引起多种医院感染和社区感染性疾病,例如化脓性感染、心内膜炎和败血症,并且随着其抗生素耐药菌株的出现使其成为临床治疗的难题^[1-2]。此外,金葡菌在自然界也广泛存在。金葡菌对外界环境有较强的抵抗能力,并可通过各种途径和方式污染食品,分泌产生各种毒素或毒力因子,例如金葡菌肠毒素(Staphylococcal enterotoxin, SE)会引发污染了金葡菌的食物中毒,对食品安全和人类健康造成重大威胁^[3-4]。

由于高通量、低成本的新一代测序技术的出现,大量病原微生物的全基因组测序完成,通过系统分析相同种属不同菌株间在全基因组水平的差异性,可深入

了解微生物基因组特征以及个体间进化关系^[5-7]。本研究对 10 株不同疾病患者及食物来源的金葡菌进行全基因组测序,比较分析菌株基因型以及基因组中携带耐药基因和毒力基因,探讨其系统发育进化关系,为进一步揭示金葡菌在感染性疾病和食物中毒等发生机制奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株 10 株医源性和食源性来源金葡菌来自于中国食品药品检定研究院中国医学细菌保藏管理中心(表 1)。

表 1 10 株金黄色葡萄球菌基因组特征
Table 1 Genomic characteristics of 10 *Staphylococcus aureus* strains

菌株名称 Strain	分离来源 Source	基因组大小 (bp) Genome size	基因数量 (个) Gene number	编码基因 GC 含量(%) GC content of coding gene	编码区比例 (%) Coding region/ Genome length	平均基因大小 (bp) Average gene length
CMCC(B) 26001	NA	2743125	2542	33.54	81.73	881
CMCC(B) 26002	骨髓炎患者	2745811	2554	33.62	82.61	888
CMCC(B) 26068	NA	2746383	2529	33.59	82.04	890
CMCC(B) 26071	奶油派	2711711	2498	33.61	82.36	894
CMCC(B) 26072	火腿	2778237	2555	33.53	82.29	894
CMCC(B) 26074	鸡肉	2700806	2486	33.66	81.94	890
CMCC(B) 26075	儿童排泄物	2837587	2628	33.54	80.96	874
CMCC(B) 26203	胸膜炎患者	2730777	2507	33.57	82.99	903
CMCC(B) 26305	凉拌菜	2785909	2612	33.50	81.84	872
CMCC(B) 26592*	败血症患者	2853756	2648	33.49	82.78	892

注:为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。NA:未知。

1.2 主要试剂和仪器 普通营养琼脂培养基,购于北京三药公司科技开发公司;DNA 提取试剂盒为德国 Qiagen 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。细菌培养箱为中仪国科(北京)科技有限公司生产。

1.3 细菌培养 将 10 株金葡菌复苏后分别接种至普通营养琼脂平板培养基,按说明书要求对新鲜培养物进行细菌 DNA 提取,放置 -80 °C 保存备用。

1.4 全基因组测序 采用 illumina 公司 solexa 测序技术对提取的细菌全基因组 DNA 进行全基因组测序(由上海人类基因组研究中心完成),即利用超声仪打断 1 μg DNA,切胶回收后,将纯化的 DNA 利用 TruSeq™ DNA Sample Prep Kit-Set A (illumina, 美国)制备文库,并应用 TruSeq PE Cluster Kit (illumina, 美国)进行扩增,最后再上机进行测序反应。

1.5 生物信息学分析 应用软件 velvet V1. 2. 03,对上述下机 reads 数据进行拼装,并应用 glimmer 3. 02 进行基因预测;同时搜寻 NCBI 的 nr 库与 SEED 蛋白数据库进行基因功能注释和利用 CDD 数据库进行直系同源簇(COG)分类,通过 KEGG 数据库构建代谢通路;参考文献^[8],应用全基因组序列进行金葡菌 a 蛋白

(*Staphylococcus aureus* protein A, *spa*) 基因(<http://spa.ridom.de/index.shtml>)、MLST 型(<http://saureus.mlst.net>)和 SCCmec 分析。Virulence finder (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>)和 Resistance Gene Identifier (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>)分别用于基因组中毒力因子和耐药基因的预测分析。应用 Blast 比对分析不同菌株基因组中的特定 SE 基因和耐热核酸酶(*nuc*)基因。同时将上述不同来源的金葡菌基因组与已发表的 NCTC8325 菌株进行核心基因的系统进化树分析。

结果

1 全基因组基本特征

应用 solexa 测序技术进行金葡菌全基因组测序分析,每株测序覆盖率均超过 300 倍。采用 velvet V1. 2. 03 软件对测序数据进行拼装,每株细菌获得 51 ~ 99 个数量不等基因组 contig 片段。Contig 的 N50 数值从 50.8 ~ 10.1 Kb 不等。经拼接比对分析,10 株金葡菌的染色体全基因组序列大小均为 2.7 Mbp,不同来源菌株之间基因组大小无显著差异。在不同菌株

基因组鉴定出 2 486-2 648 个基因不等,平均长度约为 887 bp,平均编码基因占整个基因组序列约为 82.2%,不同菌株基因组结构高度相似,基因组 GC 含量相似,平均 GC 含量为 33.6%(表 1)。

2 MLST 和 spa 分型

基于全基因组序列进行 MLST 分析,在 10 株金黄色葡萄球菌共鉴定出 7 种 MLST 型,其中 CMCC(B) 26203、26592 和 26072 均为 ST8 型,CMCC(B) 26701 和 26001 为 ST464 型(图 1)。Spa 分析共有 8 种 spa 型,CMCC(B) 26072 的分析结果在数据库未能匹配已发现的 spa 型,表明其为一种新型 spa。而 CMCC(B) 26068、26071 和 26075 菌株 spa 型均为 t008 型(图 1)。

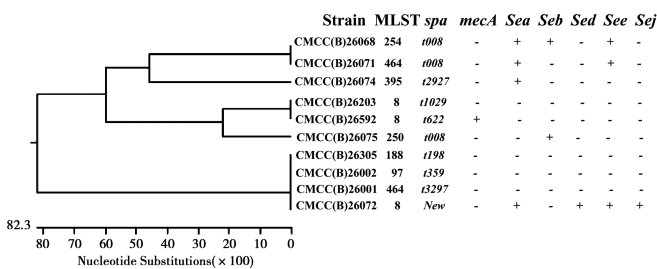


图 1 10 株金黄色葡萄球菌 nuc 基因聚类分析

Fig.1 Cluster analysis of nuc genes from 10 *S. aureus* strains

3 耐药基因

对测序菌株基因组进行耐药基因注释分析,10 株金黄色葡萄球菌携带 4~10 种数量不等耐药基因(表 2),包括抗喹诺酮类 *NorA*、抗替加环素 *MepA*、抗杆菌肽 *BacA*、抗四环素 *tet38*、抗磷霉素 *FosB*、抗林可酰胺 *MsrA* 等耐药基因。CMCC(B) 26592 MRSA 菌株基因组中 10 个耐药基因,数量最多,也仅在其基因组发现携带抗 β -内酰胺类 *mecA* 耐药基因(表 2)。分析其 SCCmec 分型,结果显示其为 SCCmec IV 型。

表 2 10 株金黄色葡萄球菌基因组携带耐药基因情况

Table 2 Summary of resistance genes in 10 *S. aureus* genomes

菌株名称 Strain	基因组中所携带的耐药基因 Drug resistance genes in the genomes
CMCC(B) 26001	<i>MepR</i> 、 <i>NorA</i> 、 <i>mgrA</i> 、 <i>arlR</i> 、 <i>LmrS</i>
CMCC(B) 26002	<i>BacA</i> 、 <i>NorA</i> 、 <i>MepA</i> 、 <i>tet38</i>
CMCC(B) 26068	<i>MepA</i> 、 <i>NorA</i> 、 <i>BacA</i> 、 <i>FosB</i> 、 <i>BL2a_pc</i>
CMCC(B) 26071	<i>NorA</i> 、 <i>BacA</i> 、 <i>tet38</i> 、 <i>MepA</i>
CMCC(B) 26072	<i>BacA</i> 、 <i>NorA</i> 、 <i>MepA</i> 、 <i>FosB</i> 、 <i>BL2a_pc</i>
CMCC(B) 26074	<i>tet38</i> 、 <i>MepA</i> 、 <i>NorA</i> 、 <i>BacA</i>
CMCC(B) 26075	<i>BacA</i> 、 <i>NorA</i> 、 <i>MepA</i> 、 <i>tet38</i> 、 <i>FosB</i> 、 <i>BL2a_pc</i>
CMCC(B) 26203	<i>NorA</i> 、 <i>BacA</i> 、 <i>MepA</i> 、 <i>tet38</i> 、 <i>FosB</i>
CMCC(B) 26305	<i>NorA</i> 、 <i>BacA</i> 、 <i>MepA</i> 、 <i>tet38</i> 、 <i>BL2a_pc</i>
CMCC(B) 26592	<i>MepA</i> 、 <i>NorA</i> 、 <i>BacA</i> 、 <i>tet38</i> 、 <i>FosB</i> 、 <i>mecA</i> 、 <i>MsrA</i> 、 <i>MphC</i> 、 <i>BL2a_pc</i> 、 <i>Aph3IIIa</i>

4 毒力基因

对基因组毒力基因进行注释分析,10 株菌株中含有大量与疾病相关的毒力因子,每株菌所携带毒力基因数量大致相同,58~66 个数量不等(图 2),主要包括与细菌粘附功能类(例如 *icaA*、*icaB* 和 *spa* 等)、胞外酶类(例如 *nuc*、*sspA* 和 *splA* 等)、宿主免疫逃逸相关(例如 *capA*、*capB* 和 *capC* 等)及毒素类(例如 *hly* 和 *lukF* 等)等毒力因子。不同菌株间多数毒力因子相同,且基因相似度较高,例如 10 株菌株间的 *nuc* 基因相似度超过 95%(图 1)。但也有一些食品来源菌株具有特定的毒力因子。例如 CMCC(B) 26071、26074 和 26072 菌株携带 1~4 种 *Sea*、*Seb*、*Sed*、*See* 和 *Sej* 数量不等的肠毒素基因(图 2)。此外,相比较其他菌株基因组仅存在一种杀白细胞素基因 *lukF*,而在 CMCC(B) 26592 MRSA 菌株中还携带另一种杀白细胞素基因 *lukM*。

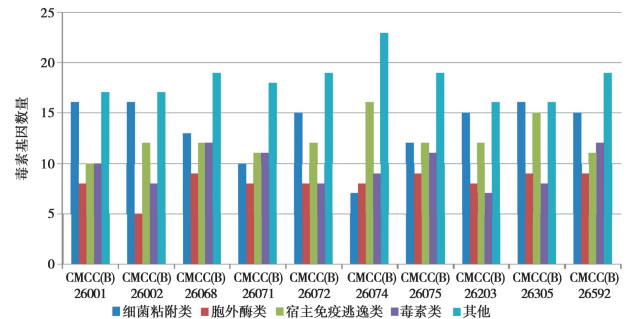


图 2 10 株金黄色葡萄球菌基因组携带的毒力基因

Fig.2 Summary of virulence factors in 10 *S. aureus* genomes

5 系统发育分析

基于全基因组核心基因进行系统发育树分析,10 株金黄色葡萄球菌可分为 3 个分支,CMCC(B) 26068 和 26075、以及均为 ST8 型的 CMCC(B) 26592 和 26072 分别形成两个独立进化分支,其他金黄色葡萄球菌聚集成一个大进化分支,并在内部又被分成 3 个亚分支。CMCC(B) 26203 和 NCTC8325 亲缘关系较近,共属于同一亚分支(图 3)。

讨论

本研究获得 10 株患者和食品来源的金葡萄球菌全基因组序列数据,证实两种不同来源金葡萄球菌的基因组大小和 GC 含量并无显著差异,基因组结构高度相似,丰富了对不同来源金葡萄球菌的特征性背景材料。

mecA 基因是 MRSA 抗 β -耐内酰胺类抗菌药物的关键因素,该基因也常用于 MRSA 的分子标记^[9-10]。因此建议当金黄色葡萄球菌基因组检出 *mecA* 基因即可定义为 MRSA 菌株^[11]。尽管可从食物中毒样品中分离到 MRSA 菌株,但本研究中的 4 株明确来自食源性的金黄色葡萄球菌以及其他 5 株菌株基因组均未发现 *mecA*

基因,表明均为甲氧西林敏感金葡菌(MSSA)菌株。基于全基因组序列进行菌株的 MLST 和 *spa* 分型,共有 7 种 ST 型和 8 种 *spa* 型,两种方法的分型结果无明显一致性,推测可能与两种分型方法基于不同的靶点相关。此外,CMCC(B) 26072(MSSA)和 CMCC(B) 26592(MRSA)均为 ST8 型。以前在南美^[12]、欧洲^[13-14]等国家报道从食品、社区来源的 MRSA 中发现 ST8 型为主要优势基因型,而很少在 MSSA 中有 ST8 型。本研究核心基因进化树分析表明这两株 ST8 型的金葡菌的进化亲缘关系较近,提示菌株之间的核心基因高度同源,进一步说明 MSSA 和 MRSA 都是来自一个近祖先,在适应不同宿主环境中,通过水平基因转移等多种进化机制,经历不同进化历程,具有不同的遗传特征,从而调控各种毒力和耐药基因的表达。

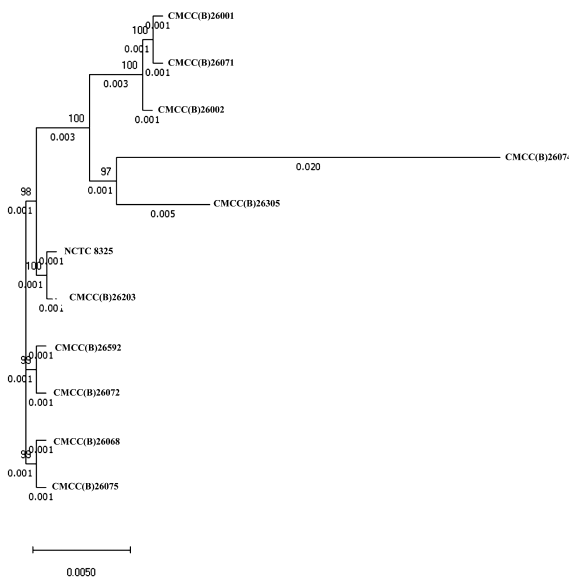


图 3 10 株金黄色葡萄球菌核心基因组系统发育树
Fig. 3 The phylogenetic tree of core genome from 10 *S. aureus* strains

相比较 MSSA 所携带耐药基因数量远少于 MRSA 基因组,但两种菌株之间的毒力因子数量无明显区别,主要包括一些与疾病相关的细菌粘附类、胞外酶、与宿主免疫逃逸、毒素类等因子。但不同菌株存在的毒力因子却不同,食品来源的金葡菌基因组携带数量不等的肠毒素基因。由金葡菌产生的肠毒素 N 端肽链具有催吐活性,极微量(0.5 ng/ml)即可食物中毒^[15]。SE 基因在金葡菌的表达由多种调控元件和 DNA 结合蛋白协调,同时还与其生长环境等因素密切相关^[16-17]。由于编码 SE 基因位于金葡菌质粒、致病岛等基因组可移动元件中^[18-19],在适宜的环境条件下容易通过水平转移等方式让其他非产肠毒素的金葡菌获得产毒特性。此外,MRSA 携带多种杀白细胞素基因。可能与这类 MRSA 菌株更易引起严重的侵袭性感染相关^[20-21]。由于金葡菌存在大量的毒力决定因子

且具有不同的作用机制,因此其致病性的分子基础是多因素的,通过全基因组测序全面了解其毒力相关基因,可为不同金葡菌致病的内在分子机制也提供新的线索。

本研究获得 10 株不同分离来源的金葡菌的全基因组序列,丰富了对于 MRSA 和 MSSA 研究的数据库信息。对这些菌株 ST 型、*spa* 型、毒力和耐药性进行比较和分子进化分析,证实食源性或医院来源金葡菌在不同环境条件下经历不同进化历程,获得不同耐药基因和毒力因子,从而具有菌株特定的分子遗传特征,这为金葡菌的分子流行病学和致病性机制研究提供了更多的数据参考。

致谢:感谢上海人类基因组研究中心郑华军、朱永强和金磊给予的帮助。

【参考文献】

[1] Hajikhani B, Goudarzi M, Kakavandi S, et al. The global prevalence of fusidic acid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: a systematic review and meta-analysis[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2021, 10(1): 75.
[2] Algammal AM, Hetta HF, Elkeshly A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): one health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic resistance, and zoonotic impact[J]. Infect Drug Resist, 2020(13): 3255-3265.
[3] Hennekinne JA, Debuyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation [J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(4): 815-836.
[4] Gabril A, Gvillla T, Barros-Vel zquez J, et al. *Staphylococcus aureus* exotoxins and their detection in the dairy industry and mastitis[J]. Toxins (Basel), 2020, 12(9): 537.
[5] Yu J, Blom J, Glaeser SP, et al. A review of bioinformatics platforms for comparative genomics. Recent developments of the edgar 2.0 platform and its utility for taxonomic and phylogenetic studies[J]. J Biotechnol, 2017(261): 2-9.
[6] Church DL, Cerutti L, Grtler A, et al. Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory[J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(4): e00053-19.
[7] Kobras CM, Fenton AK, Sheppard SK. Next-generation microbiology: from comparative genomics to gene function[J]. Genome Biol, 2021, 22(1): 123.
[8] Bartels MD, Petersen A, Worning P, et al. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for *spa* typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(12): 4305-4308.
[9] Pillai MM, Latha R, Sarkar G. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction and conventional methods: a comparative study[J]. J Lab Physicians, 2012, 4(2): 83-88.
[10] Fuda C, Suvorov M, Vakulenko SB, et al. The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of

