

doi:10.3969/j.issn.1673-6184.2019.01.004

• 论著 •

影响金黄色葡萄球菌杀白细胞素 ED 转录表达的培养条件

杨涵^{1,*}, 黄凯峰^{1,*}, 徐溯², 赵焕强¹, 徐晓刚², 胡付品², 何春燕¹, 龚芳³, 刘庆中¹

1. 上海交通大学附属第一人民医院检验医学中心, 上海 200080; 2. 复旦大学附属华山医院抗生素研究所, 上海 200040; 3. 南通大学附属南通第三医院检验科, 江苏 南通 226000

摘要:为探讨影响金黄色葡萄球菌杀白细胞素 ED(leukocidin ED, LukED)转录表达的最佳培养条件,采用定量反转录-聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测金黄色葡萄球菌 Newman 菌株 *lukE* 在 TSB、BHI、YCP、MHB 和 LB 培养基中不同生长阶段(对数生长早期、中期、晚期和平台期)的表达情况。以表达量较低的培养基为基础,分别加入表达量最高的培养基的不同成分,分析促进 *lukED* 表达的物质。结果显示, *lukE* mRNA 水平在 YCP 培养基中生长至对数晚期时表达最高; YCP 组分酵母浸出物、酪蛋白氨基酸及丙酮酸钠均能显著促进 *lukE* 转录表达,前两者效果更好。

关键词:金黄色葡萄球菌;杀白细胞素 ED;mRNA 水平;生长阶段;培养基

Effects of culture conditions on transcriptional expression of leukocidin ED of *Staphylococcus aureus*

YANG Han^{1,*}, HUANG Kaifeng^{1,*}, XU Su², ZHAO Huanqiang¹, XU Xiaogang², HU Fupin², HE Chunyan¹, GONG Fang³, LIU Qingzhong¹

1. Department of Clinical Laboratory, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China; 2. Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 3. Department of Clinical Laboratory, The Third Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu Province, China

Abstract: This study aimed to explore the optimal culture conditions for transcriptional expression of leukocidin ED (*lukED*) of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). The transcription level of *lukE* in *S. aureus* strain Newman was detected at different growth phases (early-exponential, middle-exponential, late-exponential and stationary phases) in TSB, BHI, YCP, MHB and LB media by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Based on the medium mediating the lowest transcription level of *lukE*, the different compositions of medium producing the highest mRNA level of *lukE* was added to discover the substances promoting *lukED* expression. The findings showed that *lukE* mRNA level was highest at the late-exponential phase in YCP medium, in which yeast extract, casamino acids and sodium pyruvate could all strikingly increase the expression of *lukE*, with the first two being better.

基金项目:国家自然科学基金(81772247, 81371872)

通信作者:刘庆中

Correspondence to: LIU Qingzhong E-mail: jiaodamedicine@foxmail.com

* 同为第一作者

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Leukocidin ED; mRNA level; Growth phase; Medium

金黄色葡萄球菌是医院和社区感染的重要病原体之一,可引起坏死性肺炎、中毒性休克综合征、化脓性感染等疾病,这与其分泌的多种毒素因子密切相关^[1-3],其中双组分孔杀白细胞素(leukocidin)发挥着重要作用。金黄色葡萄球菌能分泌6种双组分杀白细胞素:Panton-Valentine杀白细胞素(Panton-Valentine leukocidin, PVL;也称 LukSF-PV)、杀白细胞素ED(leukocidin ED, LukED)、 γ 溶血素(包括 HlgAB 和 HlgCB)、杀白细胞素AB(leukocidin AB, LukAB;也称 LukGH)及杀白细胞素MF'(leukocidin MF', LukMF')^[2,4-5]。这些毒素均由两个独立的水溶性亚基S和F组成。细菌感染过程中,S亚基首先识别宿主细胞膜,随后募集F亚基形成横跨细胞膜的 β 桶状孔,从而引起宿主细胞膜破裂,导致细胞死亡^[6-8]。

一直以来,PVL是金黄色葡萄球菌毒力的研究热点^[9]。近几年来,LukED在金黄色葡萄球菌致病机制中的重要作用得到越来越多实验的证实。研究表明,LukED可与巨噬细胞、T细胞和树突细胞表面的趋化因子受体CCR5,中性粒细胞、单核细胞和自然杀伤细胞表面的CXCR1/2受体及红细胞表面的DARC受体结合,引起相应靶细胞裂解,促进感染发生^[10-13]。LukED皮内注射兔子可引起明显的局部炎症和皮肤坏死反应,毒性程度与PVL引起的皮肤坏死相当^[14]。小鼠血流感染模型中,金黄色葡萄球菌lukED缺失突变株(Δ lukED)感染小鼠的生存率明显高于野生型菌株,其肝、肾等器官中细菌复制能力降低,白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)和粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)减少^[15]。流行病学资料显示,LukED与金黄色葡萄球菌所致脓疱病、抗生素相关性腹泻密切相关,且在临床金黄色葡萄球菌中呈现较高的流行率^[4-5,16]。

LukED表达受培养基、生长阶段等多种因素的影响。Gravet等^[14]研究显示,LukED在脑浸液培养基中检测不到,而在酵母提取物-酪蛋白氨基酸-丙酮酸钠(yeast extract-casamino acids-sodium pyruvate, YCP)培养基中可检测到。Bronner等^[17]采用半定量反转录-聚合酶链反应(semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, SqRT-PCR)检测YCP及其他培养基中各毒素表达情况,但准确率欠佳,且缺乏深入研

究。因此,本实验拟研究5种常用培养基及细菌生长阶段对lukED转录的影响,探讨培养基组分对lukED转录的影响,为后续LukED研究获得足量毒素奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 金黄色葡萄球菌Newman菌株由复旦大学附属华山医院抗生素研究所保存及惠赠。

1.1.2 培养基 脑心浸液肉汤(brain heart infusion broth, BHI)、胰蛋白胨大豆肉汤(trypic soy broth, TSB)、溶菌肉汤(lysogeny broth, LB)及Mueller-Hinton肉汤(Mueller-Hinton broth, MHB)购自英国Oxoid公司。YCP[30 g/L酵母提取物、20 g/L酪蛋白氨基酸、20 g/L丙酮酸钠、2.5 g/L Na₂HPO₄、0.42 g/L KH₂PO₄, pH 7.0]为本实验室自行配制,其中酵母提取物购自Oxoid公司,酪蛋白氨基酸购自美国Amresco公司,丙酮酸钠、Na₂HPO₄和KH₂PO₄购自生工生物工程(上海)股份有限公司。向LB培养基(10 g/L胰蛋白胨、5 g/L酵母提取物、10 g/L氯化钠)中分别加入YCP培养基各成分(终浓度与YCP一致),配制新的培养基并分别命名为LBY(LB+25 g/L酵母提取物)、LBC(LB+20 g/L酪蛋白氨基酸+2.5 g/L Na₂HPO₄+0.42 g/L KH₂PO₄)；实验过程中发现,只向LB中添加酪蛋白氨基酸难以溶解,因此将无机盐一并加入助其溶解)、LBP(LB+20 g/L丙酮酸钠)。

1.1.3 主要试剂及仪器 荧光定量PCR仪及NanoDrop2000超微量分光光度计为赛默飞世尔科技有限公司产品,PCR 8连管及96孔板为Axygen公司产品,紫外分光光度计为尤尼柯公司产品,蛋白酶K、RNA抽提试剂盒MiniBEST Universal RNA Extraction Kit、反转录试剂盒PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser及荧光定量试剂盒TB Green Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)购自宝生物工程(大连)有限公司,引物合成及溶葡萄球菌酶由生工生物工程(上海)股份有限公司提供,金黄色葡萄球菌裂解液由本实验室自行配制(专利号ZL201310124795.2)。

1.2 方法

1.2.1 生长曲线测定 挑取新鲜 Newman 菌株的单个菌落至 3 mL TSB 中,37 °C,150 r/min 培养过夜。随后吸取 300 μL 菌液至 30 mL 新鲜培养基中(1:100 稀释),37 °C,150 r/min 培养,每隔 1 h 取样测定 OD₆₀₀ 值,监测细菌生长情况。

1.2.2 qRT-PCR 检测 *lukE* 基因表达 收集 TSB、BHI、YCP、MHB 和 LB 五种培养基中对数生长早期(TSB、BHI、YCP 和 MHB 为 3 h, LB 为 5 h)、中期(TSB、BHI 和 YCP 为 4 h, MHB 为 5 h, LB 为 7 h)、晚期(TSB、BHI 和 YCP 为 5 h, MHB 为 7 h,

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab. 1 Primers used for qRT-PCR

Gene	Sequence (5'-3')		Reference
<i>lukE</i>	F	GAAATGGGGCGTTACTCAA	18
	R	GAATGGCCAAATCATTGTT	18
16S rRNA	F	CGTGCTACAATGGACAATACAA	19
	R	ATCTACGATTACTAGCGATTCCA	19

为研究 YCP 培养基成分对 *lukE* 基因表达的影响,分别检测 Newman 菌株于 LBY、LBC 和 LBP 培养基 5 h 培养物中 *lukE* mRNA,以 LB 和 YCP 培养基同一时间的培养物为对照。

1.3 统计学分析

用 SAS 软件进行统计学分析,两样本比较采用 *t* 检验,两个以上样本的比较采用方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生长曲线

Newman 菌株在 TSB、BHI、YCP、MHB 和 LB 培养基中的生长曲线(图 1A)显示,其在 BHI、TSB

LB 为 9 h)及平台期(TSB、BHI 和 YCP 为 7 h, MHB 为 9 h, LB 为 11 h)菌液,4 °C,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用含 100 μL 裂解液、10 μL 蛋白酶 K 和 10 μL 溶葡萄球菌酶的溶液重悬菌体,56 °C 裂解 1 h。用 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取细菌 RNA,去除基因组 DNA 后,反转录为 cDNA。以 16S rRNA 为内参基因,qRT-PCR 测定 *lukE* 基因 mRNA 表达(TB Green Premix Ex Taq)(*LukED* 由共转录于一条 mRNA 的 *lukE* 和 *lukD* 两个基因编码,因此检测 *lukE* 基因可反映 *lukED* 的表达)。引物序列见表 1^[18-19]。

和 YCP 培养基中生长速度较快,2~3 h 后进入对数生长期,7~9 h 后进入平台期;在 MHB 和 LB 培养基中生长较慢,3~4 h 后进入对数生长期,12 h 后进入平台期。

Newman 菌株在 LB、LBY、LBC 及 LBP 培养基中的生长曲线(图 1B)显示,添加酪蛋白氨基酸的 LBC 培养基中细菌生长速度最快,6~8 h 进入平台期;添加酵母浸出物(LBY)或丙酮酸钠(LBP)的培养基中细菌生长较 LB 稍好。

2.2 生长阶段对 *lukE* 表达的影响

根据图 1A 中的生长曲线,挑选 TSB、BHI、YCP、MHB、LB 培养基中对数生长早期、中期、晚期及平台期细菌进行研究。在 TSB、BHI 和 YCP

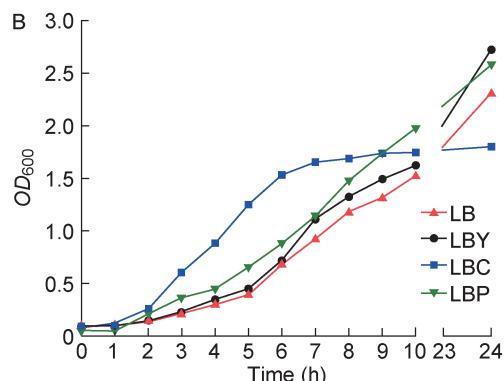
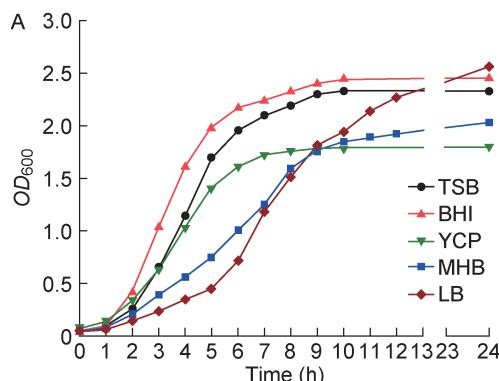
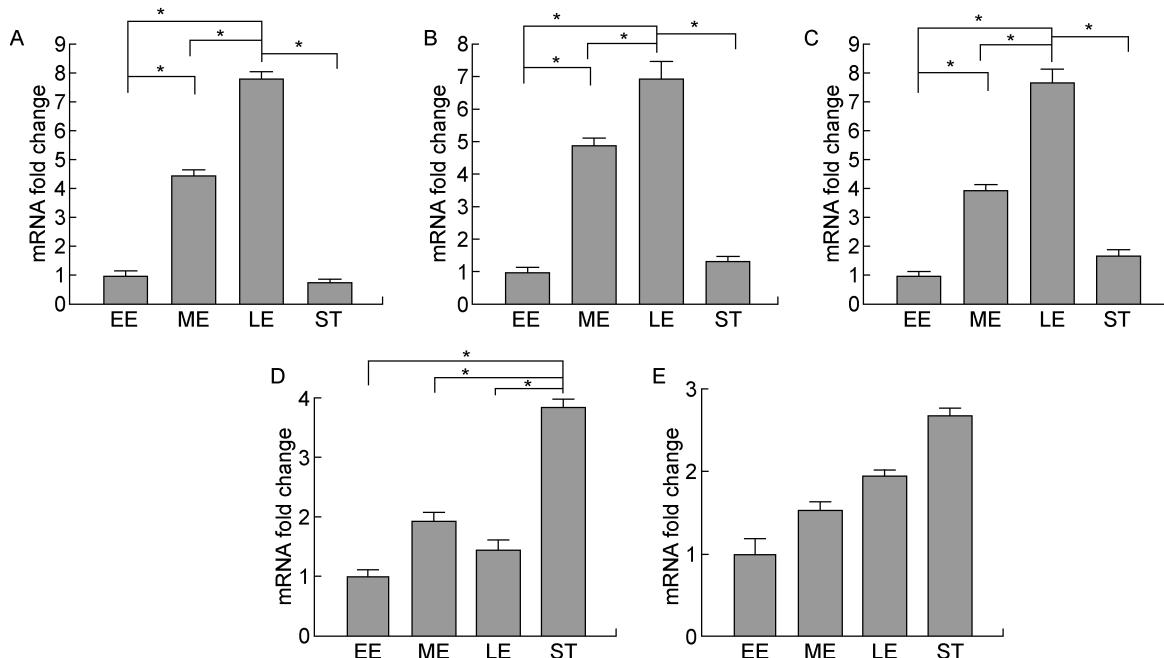


图 1 金黄色葡萄球菌 Newman 菌株在不同培养基中的生长曲线

Fig. 1 The growth curves of *S. aureus* Newman strains cultured in different media

培养基中,从对数生长早期到晚期, *lukE* 基因表达显著增加,并在对数生长晚期达到最高水平(图 2A、2B、2C)。相对于对数生长早期,对数中、晚期变化倍数分别为 TSB: 4.48 和 7.82; BHI: 4.90 和 6.90; YCP: 3.97 和 7.71($P<0.05$)。随后进入平台期, *lukE* 基因转录水平显著下降,与对数生长早

期水平相当($P>0.05$)。在 MHB 培养基中,对数生长早、中、晚期 *lukE* 基因表达无显著差异,而平台期显著增加(为对数早期的 3.85 倍)($P<0.05$) (图 2D)。在 LB 培养基中, *lukE* 基因表达在整个生长周期中虽有增加趋势,但差异没有统计学意义($P>0.05$) (图 2E)。



The data are presented as mean \pm SD (3 independent experiments). Statistical analyses were performed with *t*-test and one-way analysis of variance followed by Bonferroni posttest. * $P<0.05$. A: Tryptic soy broth (TSB). B: Brain heart infusion broth (BHI). C: Yeast extract-casamino acids-pyruvate (YCP). D: Mueller Hinton broth (MHB). E: Lysogeny broth (LB). EE, early-exponential phase; ME, middle-exponential phase; LE, late-exponential phase; ST, stationary phase.

图 2 *lukE* 基因在金黄色葡萄球菌 Newman 菌株不同生长阶段的相对表达

Fig. 2 Relative transcription levels of *lukE* in *S. aureus* Newman strains at different growth phases

2.3 培养基对 *lukE* 表达的影响

表 2 比较了各培养基中 *lukE* 表达的差异。可看出,YCP 培养基中 *lukE* mRNA 水平在各生长时期均显著高于 TSB 和 BHI 培养基中对应时期:在对数生长早期,YCP 培养基中 *lukE* 表达量是 TSB 的 4.73 倍,是 BHI 的 3.85 倍;在对数生长中期,YCP 培养基中 *lukE* 表达量是 TSB 的 4.19 倍,是 BHI 的 3.11 倍;在对数生长晚期,YCP 培养基中 *lukE* 表达量是 TSB 的 4.66 倍,是 BHI 的 4.28 倍;在平台期,YCP 培养基中 *lukE* 表达量是 TSB 的 10.03 倍,是 BHI 的 4.80 倍($P<0.05$)。比较 TSB 与 BHI 培养基,发现对数中期和平台期中 *lukE* 表达水平在 BHI 培养基高于 TSB 培养基($P<0.05$),对数早期和对数晚期无显著差异($P>0.05$)。LB 培养基中 *lukE* 基因表达水平较低:

lukE 在 LB 培养基中的表达量在对数生长早期是 TSB 的 0.50 倍($P>0.05$),在对数生长中期是 TSB 的 0.17 倍($P<0.05$),在对数生长晚期是 TSB 的 0.13 倍($P<0.05$),而在平台期是 TSB 的 1.68 倍($P<0.05$)。MHB 培养基中 *lukE* 表达最低:*lukE* 在 MHB 培养基中的表达量在对数生长早期是 TSB 的 0.25 倍($P<0.05$),在对数生长中期是 TSB 的 0.11 倍($P<0.05$),在对数生长晚期是 TSB 的 0.05 倍($P<0.05$),而在平台期与 TSB 无显著差异($P>0.05$)。

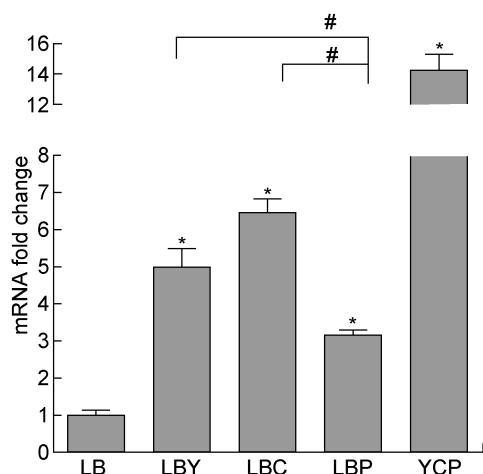
上述结果表明,YCP 培养基最适合 *lukE* 表达。本研究进一步探讨了 YCP 培养基中何种成分促进 *lukE* 基因表达水平。图 3 显示,LBY、LBC、LBP 培养基中 *lukE* 表达水平分别是 LB 的 4.98、6.46 和 3.15 倍 ($P<0.05$),表明加入 LB 培养基中的酵

表2 Newman菌株lukE基因在各培养基不同生长阶段中的相对表达量

Tab. 2 Relative transcription levels of *lukE* in *S. aureus* Newman strains at different media and growth phases

Media	Growth phase			
	Early-exponential	Middle-exponential	Late-exponential	Stationary
TSB	1±0.24	4.48±0.27	7.82±0.36	0.80±0.11
BHI	1.23±0.26	6.03±0.40*	8.51±0.99	1.67±0.23*
YCP	4.73±0.83*	18.76±1.33*	36.41±2.84*	8.02±1.22*
MHB	0.25±0.04*	0.48±0.05*	0.36±0.06*	0.96±0.05
LB	0.50±0.14	0.77±0.07*	0.98±0.04*	1.34±0.06*

The data are presented as mean±SD (3 independent experiments). Statistical analyses were performed with *t*-test and one-way analysis of variance followed by Bonferroni posttest. * $P<0.05$ compared with TSB medium in the same growth phase.



The data are presented as mean±SD (3 independent experiments). Statistical analyses were performed with *t*-test and one-way analysis of variance followed by Bonferroni posttest. * $P<0.05$ compared with LB group, # $P<0.05$ compared with LBP group.

图3 YCP培养基主要成分对金黄色葡萄球菌Newman菌株lukE基因表达的影响

Fig. 3 The effects of main compositions of YCP medium on transcription levels of *lukE* in *S. aureus* Newman strains

母浸出物、酪蛋白氨基酸和丙酮酸钠均可促进 *lukE* 基因表达。统计学分析显示, LBY 与 LBC 培养基之间 *lukE* 表达无显著差异($P>0.05$), 但均显著高于 LBP 培养基($P<0.05$)。

3 讨论

金黄色葡萄球菌 LukED 毒素于 1998 年由 Gravet 等发现^[14], 随后发现其在金黄色葡萄球菌致病机制中发挥重要作用^[4,5,20], 并可能成为金黄色葡萄球菌感染抗毒素治疗的潜在新靶点。因此, 如何在体外获得大量 LukED, 对其研究非常必要。

本研究显示, 在细菌不同生长阶段 *lukE* 基因

的表达有较大差异, 推测可能与细菌群体感应系统有关。金黄色葡萄球菌具有多种调控系统, 包括双组分信号调节系统(如 Agr)和转录因子(如 Rot)等。Agr 系统通过群体感应机制进行调控^[21], 细胞生长起始时密度低, 细菌产生的自诱导肽(autoinducing peptide, AIP)浓度也低, Agr 系统低表达。细胞生长至一定密度时, AIP 达到阈值浓度, Agr 系统表达增加, 效应分子 RNAⅢ 表达增加, 促进毒素表达。研究表明, Agr 通路能有效调节 LukED 毒素的产生^[15]。Alonzo 等^[15]分别用金黄色葡萄球菌 Newman 野生株、*agr* 敲除株(Δagr)感染小鼠, 发现 Δagr 菌株 LukED 表达量大大降低, 毒力明显减弱, 小鼠耐受而不发生感染。因此推测, 细菌生长阶段对 *lukE* 表达的影响可能部分是通过群体感应系统实现的。Newman 菌株在对数生长早期时 Agr 系统低表达, *lukE* 表达也保持在低水平; 至对数中、晚期, 细菌产生的 AIP 增多, Agr 系统表达增加, *lukE* 表达增加; 而在平台期 *lukE* 表达骤减, 可能与核糖核酸酶水平升高、细菌营养不足及 mRNA 不稳定等因素相关^[22]。

本研究结果显示, 培养基组成对 Newman 菌株 *lukE* 的表达有重要影响。在 TSB、BHI、YCP、MHB 和 LB 五种培养基中, YCP 最有利于 *lukE* 表达, TSB 和 BHI 中 *lukE* 表达尚可, 而 MHB 和 LB 中 *lukE* 表达非常低。YCP 培养基主要由酵母浸出物、酪蛋白氨基酸和丙酮酸钠构成。酵母浸出物是一种以面包酵母、啤酒酵母或葡萄酒酵母为原料, 通过自溶、酶解等工艺制成的富含蛋白质、多肽、氨基酸、维生素及微量元素的产品, 是微生物培养的优质氮源^[23]。提高酵母浸出物的浓度能增加细菌营养, 促进细菌生长, 从而促进毒力基因表达。这可能是 LB 培养基中虽然含有酵母提取物, 但浓度较低, 致

使 *lukE* 表达较低的原因。酪蛋白氨基酸富含氨基酸, 常用于配制培养基, 用于金黄色葡萄球菌培养。丙酮酸钠是重要的中间代谢物, 具有抗氧化性, 在异养细菌培养中可替代葡萄糖作为碳源^[24]。研究表明, 丙酮酸钠可有效消除过氧化氢对细菌的损伤作用^[25], 添加了 0.3% 丙酮酸钠的 TSB 培养基可使非可培养状态 (viable but non-culturable, VBNC) 的金黄色葡萄球菌恢复生长^[26]。本研究显示, 向 LB 中分别添加酵母浸出物、酪蛋白氨基酸和丙酮酸钠均能促进 *lukE* 基因表达, 但前两者的促进效果明显强于后者。

类似地, CCY 培养基一直被认为是产生 PVL 的最佳培养基^[27], 其组分包括 30 g/L 酵母浸出物、20 g/L 酪蛋白氨基酸、23 g/L 丙酮酸钠、6.3 g/L Na₂HPO₄、0.41 g/L KH₂PO₄, pH 6.7^[27]。比较 CCY 与 YCP 配方, 发现两者很相似, 只有丙酮酸钠及 Na₂HPO₄ 的含量有区别, KH₂PO₄ 的含量轻微不同。推测营养丰富的培养基更有利于杀白细胞毒素的表达。

总之, 本研究表明对数生长后期是 *lukED* 表达的最佳时期, 相较于 TSB、BHI、LB 和 MHB 培养基, YCP 培养基最适合 *lukED* mRNA 表达, 其中酵母浸出物和酪蛋白氨基酸是促进 *lukED* mRNA 表达的主要成分。

参考文献

- [1] David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(3): 616-687.
- [2] Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012, 2: 12. doi: 10.3389/fcimb.2012.00012.
- [3] Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 17: 32-37.
- [4] 杨涵, 刘庆中. 金黄色葡萄球菌杀白细胞素 ED 的研究进展 [J]. 微生物与感染, 2017, 12(6): 385-390.
- [5] Alonzo F 3rd, Torres VJ. The bicomponent pore-forming leukocidins of *Staphylococcus aureus* [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2014, 78(2): 199-230.
- [6] Alonzo F 3rd, Torres VJ. Bacterial survival amidst an immune onslaught: the contribution of the *Staphylococcus aureus* leukotoxins [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9 (2): e1003143.
- [7] Nocadello S, Minasov G, Shuvalova L, Dubrovska I, Sabini E, Bagnoli F, Grandi G, Anderson WF. Crystal structures of the components of the *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED [J]. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2016, 72(Pt 1): 113-120.
- [8] Galy R, Bergeret F, Keller D, Mourey L, Prevost G, Maveyraud L. Crystallization and preliminary crystallographic studies of both components of the staphylococcal LukE-LukD leukotoxin [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2012, 68(Pt 6): 663-667.
- [9] Bakthavatchalam YD, Nabarro LEB, Ralph R, Veeraraghavan B. Diagnosis and management of Panton-Valentine leukocidin toxin associated *Staphylococcus aureus* infection: an update [J]. *Virulence*, 2017. doi: 10.1080/21505594.2017.1362532.
- [10] Spaan AN, Reyes-Robles T, Badiou C, Cochet S, Boguslawski KM, Yoong P, Day CJ, de Haas CJ, van Kessel KP, Vandenesch F, Jennings MP, Le Van Kim C, Colin Y, van Strijp JA, Henry T, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* targets the duffy antigen receptor for chemokines (DARC) to lyse erythrocytes [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 18(3): 363-370.
- [11] Reyes-Robles T, Alonzo F 3rd, Kozhaya L, Lacy DB, Unutmaz D, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection [J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 14(4): 453-459.
- [12] Alonzo F 3rd, Kozhaya L, Rawlings SA, Reyes-Robles T, DuMont AL, Myszka DG, Landau NR, Unutmaz D, Torres VJ. CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED [J]. *Nature*, 2013, 493(7430): 51-55.
- [13] DuMont AL, Torres VJ. Cell targeting by the *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: it's not just about lipids [J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(1): 21-27.
- [14] Gravet A, Colin DA, Keller D, Girardot R, Monteil H, Prévost G. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family [J]. *FEBS Lett*, 1998, 436(2): 202-208.
- [15] Alonzo F 3rd, Benson MA, Chen J, Novick RP, Shopsin B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* leucocidin ED contributes to systemic infection by targeting neutrophils and promoting bacterial growth in vivo [J]. *Mol Microbiol*, 2012, 83(2): 423-435.
- [16] He C, Xu S, Zhao H, Hu F, Xu X, Jin S, Yang H, Gong F, Liu Q. Leukotoxin and pyrogenic toxin Superantigen gene backgrounds in bloodstream and wound *Staphylococcus aureus* isolates from eastern region of China [J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18 (1) 395. doi: 10.1186/s12879-018-3297-0.
- [17] Bronner S, Stoessel P, Gravet A, Monteil H, Prevost G. Variable expressions of *Staphylococcus aureus* bicomponent leucotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66

- (9): 3931-3938.
- [18] Balasubramanian D, Ohneck EA, Chapman J, Weiss A, Kim MK, Reyes-Robles T, Zhong J, Shaw LN, Lun DS, Ueberheide B, Shopsin B, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* coordinates leukocidin expression and pathogenesis by sensing metabolic fluxes via RpiRc [J]. *MBio*, 2016. doi: 10.1128/mBio.00818-16.
- [19] Gaupp R, Wirlf J, Wonnenberg B, Biegel T, Eisenbeis J, Graham J, Herrmann M, Lee CY, Beisswenger C, Wolz C, Tschernig T, Bischoff M, Somerville GA. RpiRc is a pleiotropic effector of virulence determinant synthesis and attenuates pathogenicity in *Staphylococcus aureus* [J]. *Infect Immun*, 2016, 84(7): 2031-2041.
- [20] Seilie ES, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 72: 101-116.
- [21] Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci [J]. *Annu Rev Genet*, 2008, 42: 541-564.
- [22] Grunberg-Manago M. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages [J]. *Annu Rev Genet*, 1999, 33: 193-227.
- [23] 陈雄, 黄煌, 胡成远, 杜支红, 李沛, 姚娟, 肖冬光, 俞学锋. 酵母浸出物的营养特性及其在微生物发酵中的应用 [J]. *食品科技*, 2009, 34(12): 253-257.
- [24] 冯梦雪, 刘伶俐, 钱生财, 宋志文. 丙酮酸钠对硝化细菌制剂活性的影响 [J]. *河北渔业*, 2012, 19(12): 7-10.
- [25] Giandomenico AR, Cerniglia GE, Biaglow JE, Stevens CW, Koch CJ. The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide [J]. *Free Radic Biol Med*, 1997, 23(3): 426-434.
- [26] Pasquaroli S, Zandri G, Vignaroli C, Vuotto C, Donelli G, Biavasco F. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68 (8): 1812-1817.
- [27] Graves SF, Kobayashi SD, Braughton KR, Diep BA, Chambers HF, Otto M, Deleo FR. Relative contribution of Panton-Valentine leukocidin to PMN plasma membrane permeability and lysis caused by USA300 and USA400 culture supernatants [J]. *Microbes Infect*, 2010, 12 (6): 446-456.

(收稿日期:2018-09-25)