

金黄色葡萄球菌生物被膜基因型的分子鉴定

李冰¹, 刘晓晨¹, 李琳¹, 徐振波^{1,2}

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 美国马里兰大学生物医学科学系, 巴尔的摩 21201)

摘要: 本文选用常见的典型食源性微生物金黄色葡萄球菌, 从食品微生物安全角度出发, 采用生物被膜菌落结晶紫染色法定量检测 58 株金黄色葡萄球菌菌株生物被膜的形成能力。并对金黄色葡萄球菌生物被膜相关基因型进行分型研究, 包括 *ica* 调控子分型 (*icaA*、*icaD*、*icaBC*) 与粘附特性分型 (*agr*、*atlE* 和 *aap*) 研究。结果显示, 所有检测菌株均能生成生物被膜, 其中 3 株能生成强粘附性生物被膜, 占 5.2%; 生成中等生物被膜能力菌株有 23 株, 占 39.7%; 32 株金黄色葡萄球菌生成弱粘附生物被膜, 占 55.2%。实验所用的 58 株菌株中有 48 株能扩增出 *icaA* 基因, 56 株扩增出 *icaD* 基因, 57 株扩增出 *icaBC* 基因, 56 株扩增出 *agr*, 分别有 53 株和 57 株染色体中存在 *aap* 和 *atlE* 基因。本实验的结论: *ica* 操纵子为金黄色葡萄球菌生物被膜形成所必须, *aap* 基因可能作为促进金黄色葡萄球菌生物被膜形成的一个独立因素。而 *atlE*、*agr* 基因是金黄色葡萄球菌生物被膜粘附过程中形成所必须的调节因子。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 生物被膜; *ica* 操纵子; *aap* 基因; *atlE* 基因; *agr* 基因

文章编号: 1673-9078(2015)7-74-79

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.013

Molecular Identification of the Genotype of *Staphylococcus aureus* Biofilm

LI Bing¹, LIU Xiao-chen¹, LI Lin¹, XU Zhen-bo^{1,2}

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Department of Biomedical Science of University of Maryland, Baltimore 21201)

Abstract: Typical foodborne *Staphylococcus aureus* (SA) was selected to investigate microbiological safety. The biofilm-forming ability of 58 SA strains was quantitatively determined using crystal violet staining of biofilm. The biofilm-associated SA genes including those associated with regulation (*icaA*, *icaD*, and *icaBC*) and adhesion property (*agr*, *atlE*, and *aap*) were studied. The result demonstrated that all strains tested formed biofilms, which were strongly adhesive in three (5.2%), moderately adhesive in 23 (39.7%) and weakly adhesive in 32 (55.2%) strains. The *icaA* gene was amplified from 48 isolates and *icaD* and *icaBC* were amplified from 56 and 57 strains, respectively. The *agr*, *aap*, and *atlE* genes were amplified from the genomes of 56, 53, and 57 isolates, respectively. The results indicated that the *ica* operon is required for SA biofilm formation, the *aap* gene may act as an independent factor for promoting SA biofilm formation, while the *atlE* and *agr* genes are necessary regulatory factors for biofilm adhesion.

Key words: *Staphylococcus aureus*; biofilm; *ica* operon; *aap* gene; *atlE* gene; *agr* gene

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, 金葡菌) 作为一种典型的致病菌, 是最重要的食源性革兰氏阳性菌之一, 由于其在自然界中无处不在, 因而食品受其污染的机会很多。在全球各个国家由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件屡见不鲜^[1]。

食品不仅含有丰富营养, 适合金黄色葡萄球菌的生长, 并且有多种形式, 如固体, 液体和流变态等。在食品中细菌会以不同的方式共存: 对于液态常悬浮于之中; 对于固态或较粘稠的流变体, 金黄色葡萄球菌很容易沾到富含营养的食品材料表面, 各种加工设备及其管道的表面形成生物被膜 (bacterial biofilm, BF)。

收稿日期: 2015-01-16

基金项目: 国家“973”计划项目 (2012CB720800); 国家自然科学基金青年基金项目 (31201362)

通讯作者: 徐振波, 男, 讲师, 研究方向: 食源性致病微生物安全研究

细菌生物被膜是细菌相互粘附或粘附于惰性实体表面, 在繁殖分化的过程中, 分泌多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等, 将其自身包裹其中而形成一种大量微生物群体聚集的膜状结构^[2]。生物膜的形成过程分为两个阶段: 粘附阶段和聚集阶段。而生物被膜的聚集及成熟阶段, 主要是依靠促进细菌相互聚集的多糖黏附素, 特别是多糖胞间黏附素 (polysaccharide intercellular adhesion, PIA) 发挥重要作用, PIA 是细菌在生物膜形成过程中至关重要的物质, 由 *ica* 操纵子表达的酶进行生物合成^[3-6]。*agr* 基因通过上调一种表面活性剂样多肽的表达增强生物被膜的脱离作用, 即生物被膜中的细胞从生物被膜结构中脱离形成浮游细胞以到达另一位点重新形成生物被膜^[7]。还有细菌黏附聚集相关蛋白如聚集相关蛋白 (accumulation associated protein, *aap* 基因编码)、自溶素 E (autolysin E, *atlE* 基因编码)

等也参与了生物膜的形成。因此,对生物被膜的基因型进行研究与分析,有助于在分子水平上深入阐述食源性细菌形成生物被膜的总体能力,包括其粘附、被膜成熟与脱落,以及被膜表面构架蛋白与基质多糖生成的菌体特性等。

本实验通过分析金黄色葡萄球菌生物被膜的生成能力,对生物被膜形成的相关基因 *ica* 调控子(*icaA*、*icaD* 和 *icaBC*) 与粘附作用相关因子 (*agr*、*atlE* 和 *aap*) 进行基因分型,从分子水平上阐述了金黄色葡萄球菌的生物被膜生成,为生物被膜的粘附、成熟与脱落等作用提供了研究基础,为进一步实现对金黄色葡萄球菌生物被膜进行安全控制提供了科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株

本实验共检测 56 株金黄色葡萄球菌,经常规生化鉴定和多重 PCR 方法确定耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*, MRSA) 共 52 株,甲氧西林敏感型金黄色葡萄球菌

(methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA)3 株,耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌 (methicillin-resistance coagulase-negative staphylococci, MRCNS)3 株,甲氧西林敏感型金黄色葡萄球菌 MSSA 质控菌株 ATCC25923,为本实验室保存。

1.2 实验试剂与设备

2×Taq PCR MasterMix、DNA Marker、Tritonx-100、蛋白酶 K、溶菌酶基因组提取试剂盒(广东东盛生物科技有限公司),西班牙琼脂糖,EDTA,结晶紫,血琼脂平皿,胰酶大豆肉汤培养基 TSB(广东环凯微生物有限公司)。PCR 扩增仪,凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司),酶标仪(SUNRISE 公司)。电泳仪,离心机,生化培养箱,超净台,低温冰箱,电子天平,96 孔板。

1.3 PCR 引物

金黄色葡萄球菌生物被膜相关基因型 *icaA*、*icaD*、*icaBC*、*agr*、*atlE* 和 *aap* 基因引物序列由英潍捷基(广州)贸易有限公司合成,见表 1。

表 1 *icaA*、*icaD*、*icaBC*、*agr*、*atlE* 和 *aap* 基因引物序列

Table 1 Primers for the *icaA*, *icaD*, *icaBC*, *agr*, *atlE*, and *aap* genes

目标产物	引物设计	引物序列	退火温度/℃	扩增产物大小/bp	引文
<i>icaA</i>	A1	5'-TCTCITGCAGGAGCAATCAA-3'	56	198	[8]
	A2	5'-TCAGGCACTAACATCCAGCA-3'			
<i>icaD</i>	D1	5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3'	56	198	[8]
	D2	5'-CGTGTITTTCAACATTTAATGCAA-3'			
<i>icaBC</i>	B1	5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3'	52	1188	[9]
	B2	5'-GCACGTAATATACGAGTTA-3'			
<i>agr</i>	G1	5'-GTGCCATGGGAAATCACTCCTTCC-3'	52	976	[9]
	G2	5'-TGGTACCTCAACTTCATCCATTATG-3'			
<i>atlE</i>	E1	5'-ACACCCGATTAGCAGAC-3'	57	432	本研究
	E2	5'-AGCTCCGACAGATTACTT-3'			
<i>aap</i>	P1	5'-GAAATGACTGAA CGTCCGAT-3'	55	465	[10]
	P2	5'-GCGATCAATGTTACCGTAGT-3'			

1.4 实验方法

1.4.1 结晶紫染色法检测生物被膜形成能力

生物被膜形成能力检测采用 96 孔板培养、结晶紫染色法建立生物模型^[11]。取过夜培养的菌液稀释 100 倍后再放到新鲜的 TSB 中再培养 2 h 以获得对数生长期的金黄色葡萄球菌,在 600 nm 光密度下稀释培养液浓度至 0.001。以 200 μL/孔培养液加入到无菌 96 孔板中,37 °C 培养 48 h。培养结束后,弃去培养基,

用无菌生理盐水洗涤 3 次,以除去杂质和浮游菌;然后在各孔中加甲醇 200 μL 固定生物被膜,15 min 后弃去甲醇,晾干后再用 0.01% 的无菌结晶 200 μL 紫染色 15 min。染色结束后,用无菌水冲洗去多余染液,洗涤两次。最后采用 95% 的乙醇将附着的结晶紫洗脱下来。移取 125 μL 洗脱液于新的酶标板,于 540 nm 处测定吸光值。其中每个样品需在每次实验中重复 8 个孔,而每次实验需要重复 3 次。采用 200 μL 的培养基作为空白对照。

OD 值可反映生物被膜与接触表面粘附的牢靠程度,依据临界 OD 值(OD_c 等于空白孔的平均 OD 值加上其 3 倍标准差而得到的 OD 值)可对生物被膜分类: $OD \leq OD_c$ 为不粘附(0), $OD_c < OD \leq 2OD_c$ 为弱粘附(+), $2OD_c < OD \leq 4OD_c$ 为中等粘附(++), $OD > 4OD_c$ 为强粘附(+++)^[12]。

1.4.2 金黄色葡萄球菌生物被膜基因型的分子鉴定

相关基因型 *icaA*、*icaD*、*icaBC*、*agr*、*atlE* 和 *aap* 基因引物序列由英潍捷基(广州)贸易有限公司合成。

1.4.2.1 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的提取

对 58 株金黄色葡萄球菌进行基因组 DNA 提取,采用试剂盒法:首先接种 5 μ L 菌液于 5 mL LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜培养。取菌液 3 mL 置于 1.5 mL 无菌离心管中,12000 r/min 离心 1 min 后弃上清并加入 180 μ L 缓冲液(20 mM Tris、pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% Triton100)和终浓度为 20 mg/mL 的溶菌酶,混匀后 37 $^{\circ}$ C 反应 60 min,随后分别加入 4 μ L RNase A (100 mg/mL)室温 5 min、20 μ L 蛋白酶 K,55 $^{\circ}$ C 反应 30 min、220 μ L 裂解液 MS(振荡至形成悬浮液,65 $^{\circ}$ C 15 min 至溶液变清亮)与 220 μ L 无水乙醇。离心并弃滤液后,分别通过蛋白液 PS 与漂洗液 PE 洗涤,以彻底去除纯化柱中残留的液体。洗脱纯化柱中的 DNA,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.4.2.2 *ica* 调控子基因分型

以上述制备的细菌 DNA 为模板,对菌株进行 *ica* 调控子基因型鉴定,实验通过 PCR 技术进行鉴定,扩增程序如下:(1)*icaA* 和 *icaD* 基因 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 40 次,末次循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。(2)*icaBC* 基因 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 30 次,末次循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4.2.3 粘附相关基因分型

对菌株进行被膜粘附相关基因分型,包括 *agr*、*aap* 与 *atlE*,其中扩增程序如下:(1)*agr* 基因 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 30 次,末次循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。(2)*aap* 基因:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,循环 35 次,末次循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。(3)*atlE* 基因:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 30 次,末次循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

2 结果与讨论

生物被膜的形成使得微生物容易感染宿主并生存下来。微生物藏匿于生物被膜中,在食品加工过程中被长期忽视,最近几年在乳制品和肉制品加工中出现了相关报道^[13-14]。生物被膜的清除和防治是食品生产过程中的一大难题。要了解金黄色葡萄球菌变异的分子基础和生物被膜形成的机理,就要究其生物被膜形成的基因型。此次调查研究为金黄色葡萄球菌生物被膜生成机理在基因层面提供了重要信息,有助于了解当前细菌生物被膜生成状况,对其进行预防和控制及保证食品安全,具有重要的现实意义。

2.1 生物被膜形成能力实验结果

研究通过结晶紫染色定量法对金黄色葡萄球菌生物被膜生成量进行半定量分析,根据测量 OD 值反映菌株生物被膜与硅胶表面粘附的牢固程度分类,所有检测菌株均能生成生物被膜,其中生成强生物被膜粘附性的菌株 3 株,占 5.2%;生成中等生物被膜能力菌株 23 株,占 39.7%;32 株金黄色葡萄球菌生成弱粘附生物被膜,占 55.2% (表 2)。

表 2 菌株生物被膜定量检测

Table 2 Quantitative detection results for the bacterial biofilm

生物被膜粘附牢固程度	不粘附 (0)	弱粘附 (+)	中等粘附 (++)	强粘附 (+++)
菌株数目(n)	0	32	23	3

2.2 生物被膜相关基因型结果与分析

2.2.1 *ica* 调控子基因型结果与分析

结果表明,实验所用的 58 株金黄色葡萄球菌中 48 株能扩增出 *icaA*, 56 株扩增出 *icaD*, 57 株扩增出 *icaBC*。*ica* 操纵子由 4 个基因组成 *icaADBC*, 其编码的产物共同催化合成在葡萄球菌生物膜形成过程中细菌粘附的关键物质多糖胞间黏附素-PIA。据报道 *icaA* 和 *icaD* 在金黄色葡萄球菌生物被膜形成过程中发挥重要作用^[15]。*icaA* 基因编码的 N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶,该酶可促进 PIA 的形成。此外,*icaD* 基因的表达可促进 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶的活性大大增加从而导致 PIA 合成。因此 *icaA* 和 *icaD* 基因对金黄色葡萄球菌生物被膜的形成起重要作用。本实验中的 58 株金黄色葡萄球菌,47 株为 *icaA*、*icaD* 基因联合表达的菌株,其中 3 株是强粘附型。提示基因型 *icaA+icaD+* 与金黄色葡萄球菌生物膜形成密切相关。曾有研究表明生物被膜阳性菌株 *icaA+icaD+* 是同步出现的,而生物被膜阴性菌株中是 *icaA-icaD-*^[16]。但是本实验中显示,81.3%(47/58)的生物被膜阳性菌株符合此特征,还有 17.2%(10/58)是 *icaA-icaD+* 或者

icaA+icaD-基因型,而有一株 *icaA-icaD*-显示生物被膜粘附为中等,显示除了 *icaA*, *icaD* 基因能控制生物被膜形成或许还有另一条途径可以生成生物被膜,这与 Gad 等人研究不一致。

基因 *icaBC* 处于 *icaAD* 的下游,编码一种对多糖抗原的受体蛋白。本实验 58 株生物被膜阳性菌株中 46 株 79.3%可以扩增出 *icaADBC*, *ica* 操纵子并非所有生物被膜阳性菌株都能全部扩增出来。但是 58 株菌株都扩增到了 *ica* 操纵子中的基因,提示了 *ica* 操纵子是金黄色葡萄球菌生物被膜形成所必须的,且不依赖于 *ica* 操纵子的生物被膜形成机制,还有其它被膜形成途径有待研究。

2.2.2 粘附相关基因结果与分析

56 株扩增出 *agr*, 分别有 53 株和 57 株染色体中存在 *aap* 和 *atlE*(表 3)。基因 *agr* 是金黄色葡萄球菌附属基因调节因子,控制一系列毒素和毒力因子表达,并且能与宿主的免疫系统相互作用^[17]。但 *agr* 在感染过程中的作用似乎是有争议的,据有关研究在生物被膜的形成过程中,它的作用是减少而不是诱导生物被膜形成。*Agr* 基因通过调控提高表面活性剂多肽的表达从而增强生物被膜的脱离作用,即金黄色葡萄球菌可以从生物被膜的结构中脱离形成浮游细胞然后到达另一实体表面重新粘附形成生物被膜。通过基因分型结果显示实验所用的 58 株菌中有 56 株可以扩增出 *agr*, 提示该基因可能为金黄色葡萄球菌生存所必须,

在金黄色葡萄球菌中普遍存在。

ica 编码的 PIA 在金黄色葡萄球菌生物被膜形成中具有重要作用,但也有研究表明 *ica* 基因阴性金黄色葡萄球菌可以不依赖 PIA,通过细菌表面蛋白直接作用形成蛋白依赖的细菌生物被膜,该表面蛋白表达是由聚集相关蛋白基因 *aap* 编码的。本实验中 *aap* 基因阳性株为 53 株,有 5 株是 *aap* 基因缺失菌株,其中生物被膜强粘附性 1 株,其余 4 株均表现为生物被膜弱粘附。而在 *ica* 操纵子缺失,携带 *aap* 基因的菌株中均有生物被膜的形成。结果表明,由 PIA 介导和 *aap* 蛋白介导均可形成金黄色葡萄球菌生物膜。*aap* 是金黄色葡萄球菌聚集阶段另一个对生物膜形成发挥关键作用的基因,可能作为促进细菌生物被膜形成的一个独立因素。

金黄色葡萄球菌在初始附着阶段有多种表面蛋白参与,其中介导金黄色葡萄球菌粘附于宿主细胞的粘附因子主要是表面相关蛋白 AtlE(Autolysin E)由 *atlE* 基因编码,位于金黄色葡萄球菌细胞表面,介导细菌黏附于实体表面。AtlE 蛋白并不直接介导细菌的起始黏附,但其通过何种途径间接起作用鲜有报道。本实验中粘附素基因 *atlE* 在生物被膜阳性菌株中有 57 株携带,可见该基因在金黄色葡萄球菌中普遍存在。1 株缺失的表现为生物被膜弱粘附,预测其对生物被膜形成可能有不可或缺的作用,但具体机制还有待于进一步研究。

表 3 生物被膜相关基因型检测结果

Table 3 Results of biofilm-associated genotype testing

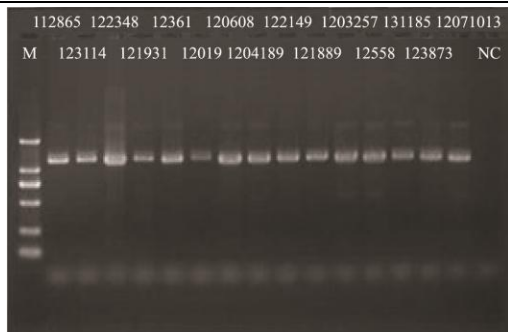
生物被膜粘附能力	<i>icaA</i>		<i>icaD</i>		<i>icaBC</i>		<i>agr</i>		<i>aap</i>		<i>atlE</i>	
	阳性菌株	阴性菌株	阳性菌株	阴性菌株	阳性菌株	阴性菌株	阳性菌株	阴性菌株	阳性菌株	阴性菌株	阳性菌株	阴性菌株
强粘附	3	0	3	0	3	0	3	0	2	1	3	0
中等粘附	18	5	22	1	23	0	22	1	23	0	23	0
弱粘附	27	5	31	1	31	1	31	1	28	4	31	1



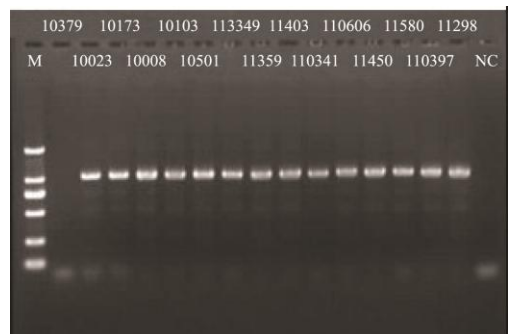
a



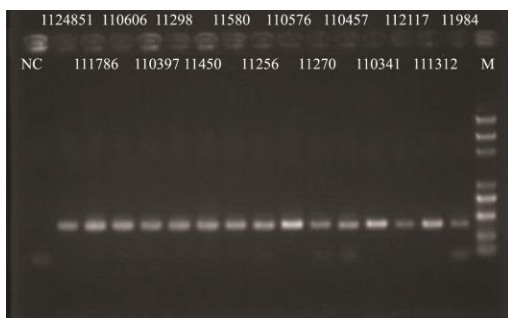
b



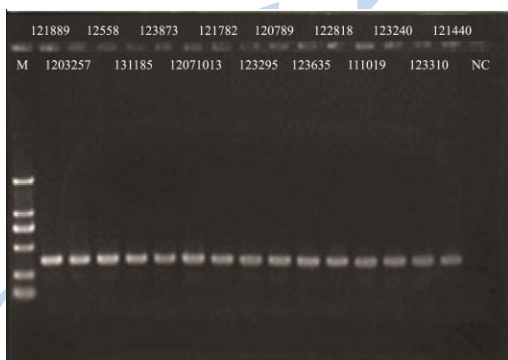
c



d



e



f

注: A: *icaA* 基因分型, B: *icaD* 基因分型, C: *icaBC* 基因分型, D: *agr* 基因分型, E: *aap* 基因分型, F: *atlE* 基因分型, A、B、E图中Marker从上到下依次是5000 bp、3000 bp、2000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp; D、C、F图中Marker从上到下依次是2000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp。

3 结论

本实验基于结晶紫染色法对生物被膜形成能力进行鉴定的基础上,进一步通过被膜相关基因型分型技术,包括 *ica* 调控子分型与粘附能力相关因子分型,对 58 株金黄色葡萄球菌的生物被膜生长能力从分子水平加以检测。结果显示,在典型的食源性微生物金黄色葡萄球菌中,生物被膜形成较为普遍,其中 100.0% (58/58) 菌株都能形成生物被膜,43.1% 以上的金黄色葡萄球菌带有强或中等被膜形成能力。研究发现 *ica* 操纵子为金黄色葡萄球菌生物被膜形成所必须, *aap* 基因可能作为促进金黄色葡萄球菌生物被膜形成的一个独立因素。而 *atlE*, *agr* 基因是金黄色葡萄球菌生物被膜粘附过程中形成所必须的调节因子。金黄色葡萄球菌生物被膜的形成是一个复杂的多基因调控的结果,要进一步确定各个基因在生物被膜形成机制中的作用,可以通过敲除这些基因进行研究,从而确定生物被膜相关基因,这也将是我们未来工作的重点。

参考文献

- [1] Le Loir Y, Baron F, Gautier M. Staphylococcus aureus and food poisoning [J]. Genet Mol. Res., 2003, 2(1): 63-76
- [2] Costerton J W. Introduction to biofilm [J]. Int. J. Antimicrob. Agents, 1999, 11: 217-221
- [3] Frank KL, Patel R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates [J]. Infection and Immunity, 2007, 75(10): 4728-4742
- [4] Boles BR, Horswill AR. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(4): e1000052
- [5] Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, et al. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(6): 1838-1850
- [6] Bischoff M, Entenza J M, Giachino P. Influence of a Functional *sigB* Operon on the Global Regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(17): 5171-5179
- [7] Yao Y, Sturdevant D E, Otto M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: Insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2005, 191(2): 289-298
- [8] Arciola C R, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of

- Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(6): 2151-2156
- [9] 孙凤军, 枉前. 临床分离金黄色葡萄球菌生物被膜相关基因的 PCR 分析 [J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(15): 1147-1149
Sun Feng-jun, Wang Qian. PCR analysis of clinically isolated *Staphylococcus aureus* biofilm associated gene [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2009, 31(15): 1147-1149.
- [10] Artini M, Papa R, Scoarughi GL, et al. Comparison of the action of different proteases on virulence properties related to the staphylococcal surface [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(1): 266-277
- [11] Petrelli D, Zampaloni C, D'Ercole S, et al. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections [J]. *Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis.*, 2006, 25, 773-781
- [12] Laura B R, Luciana R S, Vinicius Z C, et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *E coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from poultry slaughterhouse [J]. *Brazilian J of Microbiol*, 2010, 41: 1082-1085
- [13] Knight G C, Nicol R S, McMeekin T A. Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot plant-scale cheese-milk pasteurisation plant [J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, 93: 305-318
- [14] Gunduz G T, Tuncel G. Biofilm formation in an ice cream plant [J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, 89: 29-336
- [15] Kady AA, Fouda SI, Shibl AM, et al. Impact of slime dispersants and anti-adhesives on in vitro biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* on intraocular lenses and on antibiotic activities [J]. *Antimicrob Chemother*, 2009, 63(3): 480-484
- [16] Gad G F M, El-Feky MA, El-Rehewy M S, et al. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients [J]. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2009, 3(05): 342-351
- [17] Wright JS, Lyon GJ, George EA, et al. Hydrophobic interactions drive ligand-receptor recognition for activation and inhibition of staphylococcal quorum sensing [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(15): 16168-16173