

假想的脂蛋白连接酶对肺炎链球菌毒力的影响

杨晓亮, 尹楠林, 庞丹, 吴凯峰, 尹一兵, 张雪梅*

(重庆医科大学医学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要:【目的】探索假想脂蛋白连接酶(putative lipoate-protein ligase, LPL)对肺炎链球菌毒力的影响。【方法】采用长臂同源多聚酶链式反应(LFH-PCR)的方法失活 *lpl* 基因,通过 PCR、测序鉴定缺陷菌株,采用细胞实验比较缺陷菌和野生菌对宿主细胞的粘附能力,并通过动物实验观察 *lpl* 基因缺陷后菌株毒力的变化。【结果】小鼠毒力实验表明野生菌株和缺陷株半数致死时间均为 12 h,两者比较无统计学差异;缺陷菌在对宿主细胞的粘附能力明显高于野生菌株($P < 0.01$);体外荚膜染色实验表明,野生菌和缺陷菌均有荚膜。【结论】实验结果提示 *lpl* 基因对细菌粘附宿主细胞有抑制作用,但不影响其腹腔感染小鼠的能力。

关键词: 肺炎链球菌; 毒力因子; 细菌粘附; 脂蛋白连接酶

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0774-06

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, S. pn) 是严重侵袭性感染和上呼吸道感染最重要的病原体之一,可导致肺炎、脑膜炎、中耳炎和脓毒血症^[1]。病原菌侵入宿主体内后,就进入了一个生存竞争的“战场”,为了自身的生存及应对宿主免疫系统的攻击它将调整其基因表达的模式,下调一些非必需基因的表达,上调一些基因的表达,这些上调的基因很可能是病原菌在宿主体内生存所必需的,与其感染致病关系密切,称之为体内诱导基因(in vivo-induced gene, *ivi gene*),是潜在的抗生素作用靶点和疫苗候选者^[2]。在前期研究中,我们通过体内表达技术(IVET)和差异荧光诱导技术(DFI),对肺炎链球菌的体内诱导基因进行了反复筛选,得到了一系列的体内诱导基因,包括一些功能未知的假想蛋白。基因 *lpl* 就是其中之一,其表达产物为一种假想的脂蛋白连接酶(lipoate-protein ligase, LPL)。

经过生物信息学分析,该基因在产单核李斯特菌中存在一个同系物为 *lplA1*,并且已经被证实是一

个毒力因子,它的缺失会使得细菌不能从宿主摄取硫辛酸,从而影响自己的生长和毒力^[3],但未见关于 *lpl* 基因是否也影响肺炎链球菌毒力的报道,具体机制尚不清楚。因此本研究拟通过长臂同源多聚酶链式反应(long flanking homology polymerase chain reaction, LFH-PCR)方法失活 S. pn 的 *lpl* 基因^[4],再分别从细胞水平和整体水平比较该缺陷株与野生菌的毒力表达差异,以深入了解 *lpl* 基因在细菌致病过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源:肺炎链球菌 D39, 购于英国的国家典型菌种保藏中心(National Collection of Type Culture, NCTC)。雌性 BALB/c 小鼠体重 18-22 g, 购自重庆医科大学实验动物中心。人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自美国典型物种保藏中心(American typical culture collection, ATCC)。

基金项目:国家自然科学基金(30970110)

* 通信作者。Tel: +86-23-68485216; E-mail: apoe@163.com

作者简介:杨晓亮(1983-),男,河南省人,硕士生,从事肺炎链球菌毒力因子致病机理的研究。E-mail: yangxiaoliang2010@yeah.net

收稿日期:2010-01-05;修回日期:2010-03-08

1.1.2 主要试剂和仪器: C + Y 半合成培养基; 普通 TSA 板; 小牛血清白蛋白 (BSA) (Sigma); 含红霉素 0.25 ng/L 的 TSA 血平板; 肺炎链球菌 CPM8 染色体 DNA (含有红霉素抗性基因 *erm*)、感受肽刺激肽 (CSP) 由美国 Morrison. DA 教授惠赠。异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) (Sigma);

1640 培养基 (Hyclone 公司); 胎牛血清 (FCS) (Gibco); Trypsin (Diffico 进口分装); DNA 提取试剂盒 (天根)、胶回收试剂盒 (TAKARA); DNA 纯化试剂盒 (TAKARA); 引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

Table 1 The primer sequences for amplifying different genes

Gene	Primer sequence(5'→3')
P1	AACGGAAAAACAGATACAG
P2	GATAAGAAATACGGAGAAAT
P3	ATCAAACAAATTTGGGCCCGGATCATATAGAAGTTCGCCAA
P4	AATTCTATGACTGCGCTGCCGACTATGATAGAACTGGAATAA
<i>Erm</i>	forward: CCGGGCCCAAAATTTGTTTGTAT Reverse: AGTCGGCAGCGACTCATAGAAT

1.2 连接片段的制备

首先用 PCR 分别扩增出 D39 的上游片段 *lpl*-UP (P1、P3)、下游片段 *lpl*-DW (P4、P2) 和 CMP8 的 *erm* 基因, 引物 P3、P4 分别带有 22-23 个与 *erm* 基因 5' 及 3' 端两侧互补的碱基, 这样扩增出的上、下游片段就分别带有一段与 *erm* 基因互补的序列; 胶回收 3 个片段, 并定量; 再通过 PCR 用外侧引物 (P1、P2) 将这 3 个片段连接起来。胶回收连接片段, 一份用于转化, 一份送宝生物工程 (大连) 有限公司测序部测序。

1.3 肺炎链球菌实验室转化

取 -80℃ 保存的 D39 菌株 200 μL 培养于 C + Y 培养基 (10 mL C + Y 中含 1 mmol/L 的 CaCl₂ 和 2 g/L BSA) 中, 当细菌达到一定菌密度时 ($OD_{550} = 0.08 - 0.1$), 加入 CSP₂, 冰上放置 30 min, 加连接片段, 37℃ 孵育 90 min, 然后铺于含红霉素 (0.25 ng/L) 的 TSA 上, 37℃ 孵箱培养 24-48 h, 挑取血平板上的转化菌落, 于含红霉素 (0.25 ng/L) 的 C + Y 中增菌, 保存并提取 DNA。

1.4 缺陷菌株的鉴定

缺失菌株的 PCR、测序鉴定: 分别以 *lpl* 基因缺陷菌的染色体 DNA 为模板, 用 *erm* 的引物扩增 *erm* 基因; 用 P2 和 *erm* 的上游引物扩增 DW-*erm* 片段; 用 P1 和 *erm* 的下游引物扩增 UP-*erm* 片段; 用 P1、P2 扩增 UP-*erm*-DW。将 P1、P2 扩增的 UP-*erm*-DW 作胶回收, 送宝生物工程 (大连) 有限公司测序部测序。

1.5 缺陷菌株的生长情况

分别挑取野生菌和缺陷菌的单个菌落接种于 C + Y 培养基中, 37℃ 培养 12 h, 转接于 20 mL C + Y 培养基中, 37℃ 培养。定时测定吸光度值 OD_{620} , 以

吸光度为纵坐标, 时间为横坐标绘制细菌的生长曲线。

1.6 小鼠毒力实验

将野生菌及缺陷菌在 C + Y 培养基中培养至 $OD_{620} = 0.524$ (菌密度约 4×10^8 CFU/mL)。分别在 BALB/c 小鼠的腹腔内注入 0.1 ml 菌液, 每 12-13 只为一组, 两组分别注射野生菌株 (13 只), 另一组注射缺陷菌株 (12 只), 记录小鼠死亡时间, 可得到半数致死时间, 结果用 mann-whitney U 检验分析。

1.7 体内荚膜染色

将野生菌及缺陷菌采取与毒力实验相同的方法和剂量腹腔注射小鼠, 待发病, 断颈处死, 用干净的棉签蘸取腹腔液, 印于干净的玻片上, 甲醇固定干燥后, 加结晶紫染料数滴, 室温下静置 10 min, 清水冲洗, 待干镜检。

1.8 肺炎链球菌粘附实验

1.8.1 肺炎链球菌荧光素标记^[5]: 将肺炎链球菌培养到对数生长期后期 ($OD_{620} = 0.5$), 收集菌液, 4℃ 离心 10 min, 2500 r/min, PBS 洗 1 次。加入溶于 0.05 mol/L Na₂CO₃ 和 0.01 mol/L NaCl 缓冲液中的 FITC (1 g/L), 重悬细菌使浓度达到 5×10^8 cfu/mL, 4℃ 标记 1 h。无菌 PBS 洗 4 次, 用 1640 培养基重悬细菌使浓度达到 2.5×10^8 cfu/mL, 即可用于粘附实验。

1.8.2 粘附实验: 将细胞 HUVEC 接种于 24 孔培养板中, 接种密度为 2×10^4 /孔, 单层贴壁 (约 5×10^6 /孔) 后, 吸出孔内液体, PBS 洗涤 3 次, 细菌 37℃ 培养致对数生长期中期 10^8 CFU/mL, 用 1640 (10% FCS) 稀释至 10^7 CFU/mL (bacterium : cell ratio, 10:1), 取 1 mL 的菌液接种 24 孔板, 和细胞共同孵育 2 h, 没有加细胞的孔作为对照。

PBS 洗 6 次, 吸干。用荧光显微镜观察计数粘附的细菌。

1.9 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐同时采用 t 检验, 方差不齐时采用 F 检验, 小鼠毒力实验结果采用 mann-whitney U 检验分析。

2 结果

2.1 肺炎链球菌 *lpl* 基因缺失菌株的获得

分别以 D39、CMP8 的 DNA 为模板, 用 PCR 扩增出了 *lpl*-UP (355 bp)、*lpl*-DW (258 bp) 和 *erm* (780 bp) 3 个片段 (图 1-A)。LFH-PCR 连接 3 个片段: UP-*erm*-DW (1393 bp, 图 1-B), 测序结果显示 3 个片段连接正确。利用同源重组, 将连接片段转化入 D39 野生菌株, 红霉素血平板筛选出 *lpl* 基因缺陷的菌株。

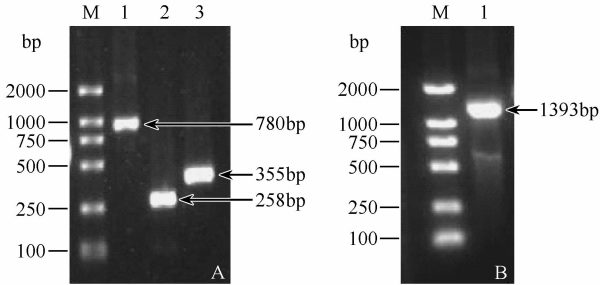


图 1 PCR 扩增 *erm*、*lpl*-Up、*lpl*-Down 的电泳结果 (A) 和 LFH-PCR 连接三个片段的电泳结果 (B)

Fig. 1 PCR products of *erm*、*lpl*-Up、*lpl*-Down (A) and PCR analysis of LFH-PCR product (B). A: Lanes M. molecular size marker; Lane 1. *erm* of CPM8; Lane 2. *lpl*-down of the D39; Lane 3. *lpl*-up of the D39. B: Lanes M. molecular size marker; Lane 1. UP-*erm*-Down fragment amplified with P1 and P2 by LFH-PCR.

2.2 *lpl* 基因缺陷菌株的 PCR、测序鉴定

D39 野生菌株在转化了连接片段后, 通过同源重组, *erm* 基因替代染色体上的 *lpl* 基因, 因此分别以 *lpl* 基因缺陷菌的染色体 DNA 为模板, 用 *erm* 的引物扩增 *erm* (约 780 bp) 基因; 用 P2 和 *erm* 的上游引物扩增 down-*erm* 片段 (约 1038 bp); 用 P1 和 *erm* 的下游引物扩增 UP-*erm* 片段 (1135 bp); 用 P1、P2 扩增 UP-*erm*-DW (1393 bp) (图 2)。测序列结果证明 3 个片段连接正确, *lpl* 基因已被 *erm* 基因所替代。

2.3 野生菌和缺陷菌的生长曲线

从生长曲线可以看出在液体培养基中 *lpl* 基因缺陷菌株较野生株生长无明显差别, 表明 *lpl* 基因缺失后没有影响细菌的生长 (图 3)。

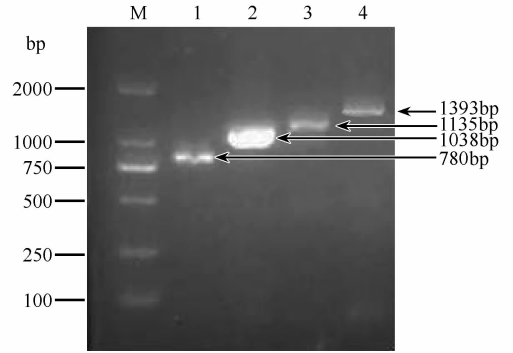


图 2 缺陷菌的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of the LPL mutant by PCR. Lanes M. molecular size marker; Lane 1. *erm* of *lpl* mutant; Lane 2. *erm*-down of the *lpl* mutant; Lane 3. *erm*-up of the *lpl* mutant; Lane 4. up-*erm*-down of the *lpl* mutant.

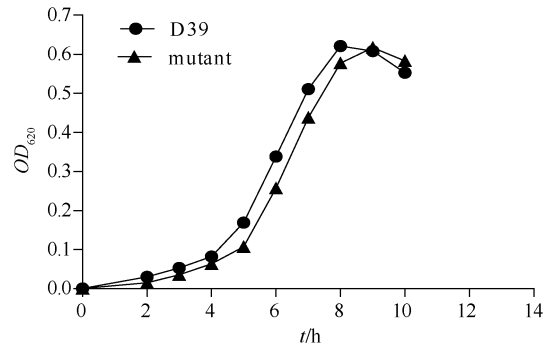


图 3 野生菌和缺陷菌的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of wild strain and *lpl*-deletion strain.

2.4 小鼠毒力实验

实验结果显示, 野生菌株和 *lpl* 基因缺陷菌株的半数致死时间均为 12 h, 无统计学差异 ($p > 0.05$, 见图 4), 表明 *lpl* 基因缺陷没有影响到肺炎链球菌感染小鼠的能力。

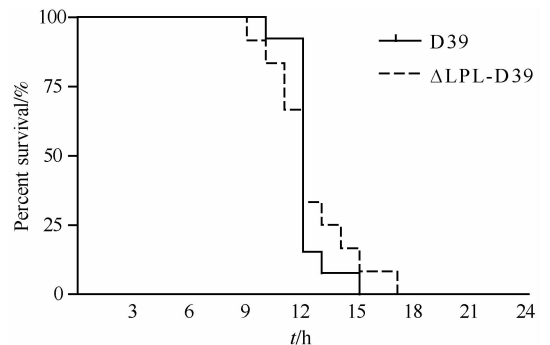


图 4 小鼠腹腔注射肺炎链球菌后毒力实验结果

Fig. 4 Survival times of mice after intraperitoneal challenge.

2.5 体内荚膜染色

体内荚膜染色结果显示: 野生菌和 *lpl* 基因缺陷菌株的菌体周围都有白色透明的带, 即厚厚的荚膜,

表明 *lpl* 基因对细菌体内荚膜的生成无显著影响。(图 5)

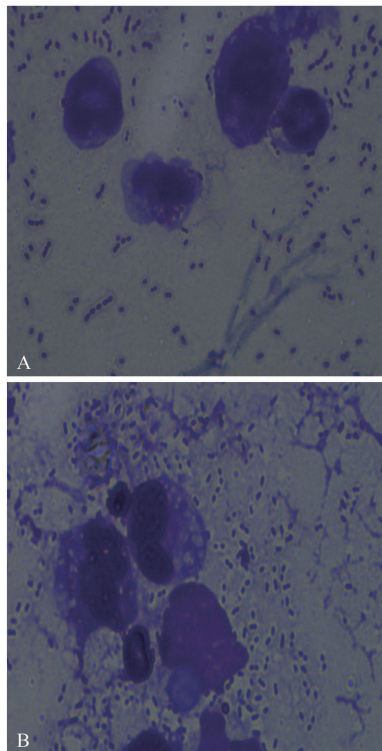


图 5 体内荚膜染色实验

Fig. 5 the results of capsule stain in-vivo. A: D39; B: D39 - Δ LPL.

2.6 肺炎链球菌细胞粘附实验

为了比较野生菌和 *lpl* 基因缺陷菌株对宿主细胞的粘附能力的差异, 我们检测了野生菌和缺陷菌对 HUVEC 的粘附能力。实验结果表明缺陷菌株对宿主细胞的粘附能力显著增强 $P < 0.01$ (图 6), 提示 *lpl* 基因可影响肺炎球菌对宿主细胞的粘附。

3 讨论

虽然荚膜是肺炎链球菌的一种主要的毒力因子, 但近年的研究显示许多蛋白分子如 *ply*、*cbpA*、*pspA* 和 *nanA* 等也对肺炎链球菌的毒力有着重要的贡献^[6-8], 对于这些毒力相关蛋白分子的研究不仅有助于进一步了解其致病的分子机制, 还可能为研究预防及治疗其感染的抗菌药物及蛋白疫苗提供候选靶点, 因此研究蛋白分子对肺炎链球菌毒力的影响成为目前理解其致病分子机制的一个研究热点。LPL 是一个体内诱导假想蛋白, 在大肠杆菌中 LPL 的同系物 LPLA (Lipoate-protein ligase A) 可催化脂蛋白酶类的脂酸和特异的赖氨酸残基之间的酰胺键形成^[9]。目前研究显示其他菌株的 LPL 同系物对其细菌的毒力有显著的影响, 但其在肺炎链球菌中

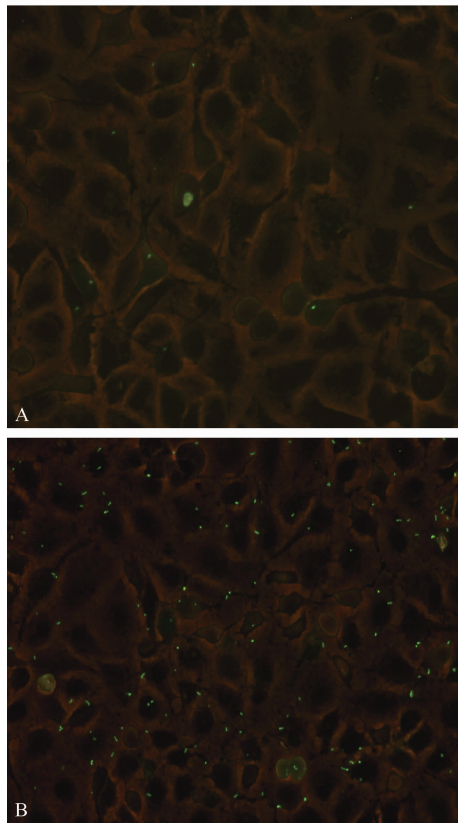


图 6 肺炎链球菌对 HUVEC 细胞的粘附实验

Fig. 6 Adherence to HUVEC by wild strain and its isogenic *lpl* deletion in vitro. A: D39; B: D39 - Δ LPL.

的作用了解甚少。本研究通过长臂同源多聚酶链式反应缺失 *lpl* 基因, 重点探索 *lpl* 基因对肺炎球菌毒力的影响。

一直以来我们认为, 肺炎链球菌对宿主细胞的粘附是其定居的生物基础, 同时也是引起宿主发病的第一关键步骤, 它主要依赖于细菌表面蛋白质和真核细胞表面的糖基的结合。然而我们的研究结果显示 *lpl* 基因缺陷菌株对 HUVEC 的粘附能力明显增加, 但腹腔感染小鼠的毒力却未见差异, 提示细菌的粘附能力与其致病性强弱并不呈正相关。这与近期的相关研究结果一致, 如致病力很强的肺炎链球菌 D39 对 HUVEC 细胞的粘附能力远远低于其无毒变异株 R6^[10]。

影响肺炎链球菌粘附能力的因素主要有荚膜和表面粘附分子^[11-12]。研究显示较厚的荚膜可能会掩盖细菌表面的粘附分子而导致粘附能力降低^[13], D39 和 R6 之间的粘附能力差异可能就是源于此, 因为 D39 有较厚的荚膜而 R6 无荚膜, 本实验室得到的 D39 其他的无荚膜变异株其粘附宿主细胞的能力也是提高的(数据未显示), 证明荚膜的确是影响粘附的一个重要因素。然而 *lpl* 基因缺陷菌株的

荚膜与野生菌株的荚膜厚薄并无显著差异,提示 LPL 可能有抑制某些表面粘附蛋白分子表达的作用,使得其缺陷菌株对宿主细胞的粘附增强,其调控机制尚需进一步研究。

综上所述,LPL 对肺炎链球菌粘附 HUVEC 细胞的能力有一定的抑制作用,但并不影响其腹腔感染小鼠的能力。本研究对假想蛋白 LPL 在肺炎链球菌感染过程中的作用进行的初步研究,为以 LPL 为靶点的疫苗和抗菌药物开发提供了理论基础。

参考文献

- [1] Marc PG, Thomas C, Yuri P, Marie PK. A review of vaccine research and development : Human acute respiratory infections. *Vaccine*,2005,27 (50) :23 5708 - 5724.
- [2] Meng JP, Yin YB, Zhang XM, Huang YS, Lan K, Cui F, Xu SX. Identification of *Streptococcus pneumoniae* genes specifically induced in mouse lung tissues. *Canadian Journal of Microbiology*, 2008,54: 58-65.
- [3] O' Riordan M, Moors MA, Portnoy DA. *Listeria* intracellular growth and virulence require host-derived lipoic acid. *Science*, 2003, 302: 462-464.
- [4] Wach A. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast*, 1996,12(3):259-65.
- [5] Zhang XM, Yin YB, Zhu D, Chen BD, Luo JY, Deng YP, Liu MF, Chen SH, Meng JP, Lan K, Huang YS, Kang GF. The Effect of Transformation on the Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Microbiology*, 2005, 43(4):337-344.
- [6] Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6: 288-301.
- [7] Rubins, JB, Charboneau D, Fasching C, Berry AM, Paton JC, Alexander JE, Andrew PW, Mitchell TJ, Janoff EN. Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1996, 153 : 1339-1346.
- [8] Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH Jr, Briles DE. PspA Protects *Streptococcus pneumoniae* from Killing by Apolactoferrin, and Antibody to PspA Enhances Killing of Pneumococci by Apolactoferrin. *Infection and Immunity*, 2004, 72:5031-5040.
- [9] Fujiwara, K, Toma S, Okamura-Ikeda, K, Motokawa Y, Nakagawa A, Taniguchi H. Crystal structure of lipoate-protein ligase a from *Escherichia coli* - Determination of the lipoic acid-binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005,280: 33645-33651.
- [10] Weiser JN, Bae D, Fasching C, Scamurra RW, Ratner AJ, Janoff EN. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003,100: 4215-4220.
- [11] Adamou JE, Wizemann TM, Barren P, Langermann S. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). *Infection and Immunity*, 1998, 66:820-822.
- [12] Swiatlo E, Champlin FR, Holman SC, Wilson WW, Watt JM. Contribution of Choline-Binding Proteins to Cell Surface Properties of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 2002,70 :412-415.
- [13] Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Müller E, Rohde M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity*, 2005, 73 : 4653-4667.

Contributions of putative lipoate-protein ligase to the virulence of *Streptococcus pneumoniae*

Xiaoliang Yang, Nanlin Yin, Dan Pang, Kaifeng Wu, Yibing Yin, Xuemei Zhang*

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: [**Objective**] To investigate the effect of putative lipoate-protein ligase (LPL) on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. [**Methods**] *lpl* gene deficient strain was constructed by LFH-PCR and identified by PCR and sequencing. The cell adherence assay and mice challenge assay were used to observe the differences between wild strain and the mutant in the pathopoiesis of *Streptococcus pneumoniae*. [**Results**] Mice virulence experiments showed that the median lethal time of wide type and the *lpl* mutant are both 12 h, no statistics difference; The ability of adherence of the mutant was greater than the wild strain ($P < 0.01$); The capsule stain in-vivo showed that the wild strain and the mutant both had the capsule. [**Conclusion**] *lpl* gene inhibits the adherence to host, but no affect on the ability to infection mice by intraperitoneal injection.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*; virulence; adherence; putative lipoate-protein ligase

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30970110)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68485216; E-mail: apoe@163.com

Received: 5 January 2010/ Revised: 8 March 2010

英语缩写语在科技写作中的正确使用

科技文章的发表是科学研究的重要组成部分。科研结果如果没有发表,就意味着科研工作没有完成。而科技文章发表的目的,就是要把科研中的新发现、或者在原有基础上的提高传播给同行、乃至跨领域以及广大普通的读者。因此,科技写作在道义上来讲,作者应该对读者负责,即:要准确、简洁、清晰地向读者传达科学研究的目的、方法、结果、结论和意义。

在科技论文的写作中,初学者经常会滥用英文缩写语。有些缩写语出现在正文中、摘要中、甚至题目中,让读者丈二和尚摸不着头脑,它究竟代表什么意思?这种滥用缩写语的做法危害之深,让一个辛辛苦苦的实验结果失去了传播知识的价值和机会!因为,除了作者自己,没有人能够看懂作者要传播什么信息。其实,这些作者过一些年以后,自己再来看自己文章中这些莫名其妙的缩写语时,他一定也会后悔莫及。借此机会,根据自己学习的体会和国际上科技文章缩写语使用的惯例,和大家探讨正确使用英语缩写语的方法。

原则上,不鼓励使用缩写语。(1)题目:根据常规,题目中一律不用缩写语。因为题目是一个非常重要的检索工具,如果作者在题目中使用缩写语,会造成人们通过检索系统找不到这篇文章,因此也就失去了传播科学技术的作用和意义。找不到你写的文章,就更谈不上你的文章被人引用的次数了。(2)摘要:同样,摘要往往是独立的,一般和正文分开被检索利用,因此也不用缩写语。对于摘要中出现的真正十分冗长的名词或短语,如果出现频率较高,例如大于六次,则可以考虑使用缩写。但是在第一次出现这个缩写语时,要把缩写语放在括号内并紧跟在缩写语所代表的名词或短语(全拼)之后,即:名词或短语全拼(缩写语),而此后就不再使用该缩写语的全名。(3)正文:正文中缩写语的使用规则和摘要中万不得已要使用的情况一样。我这里强调万不得已就是要强调尽量不用缩写语。

有一些例外的缩写语,包括度量单位如毫升(mL)、公斤(kg)、分钟(min)等,则不必全拼全名给予解释。其实即使记不住那么多的惯例和规则,始终记住你文章的可读性和信息传播的目的,你就会负责任地正确使用科技写作的英语缩写语。期待《微生物学报》能够迅速成为一个正确使用英语缩写语的净土。

注:在中文稿件中,对于正文中第一次出现的西文缩写语,应附上完整的西文名,以避免由于翻译上的不统一而造成误解。应写为:中文名(西文全名,缩写)。

(朱阳 供稿)