

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (6) :732 - 738; 4 June 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140549

## 肺炎链球菌糖代谢蛋白 CcpA 对荚膜多糖的调控作用

王丽滨<sup>1</sup>, 徐红梅<sup>1</sup>, 吴凯峰<sup>2</sup>, 郑玉强<sup>1</sup>, 王建敏<sup>1</sup>, 马峰<sup>1</sup>, 张雪梅<sup>1</sup>, 尹一兵<sup>1</sup>, 张群<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016

<sup>2</sup>遵义医学院第三附属医院检验科, 贵州 遵义 563002

**摘要:** 【目的】研究肺炎链球菌糖代谢蛋白 CcpA 对肺炎链球菌荚膜多糖 (CPS) 的调控作用。【方法】利用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 工程菌原核表达 CcpA 蛋白, 使用 Ni<sup>2+</sup> 亲和层析的方法纯化蛋白。利用纯化后的 CcpA 蛋白免疫昆明小鼠并制备多克隆抗体; 采用 ELISA 法测定抗 CcpA 抗体效价。随后, 利用 Western blot 方法分析 CcpA 蛋白在肺炎链球菌中的保守性。另外, 利用 EMSA 方法分析 CcpA 与 *cps* 基因座启动子区域片段的结合。最后, 构建 *ccpA* 基因缺失株和 *ccpA* 基因回复株; 利用 ELISA 法测定野生 D39 菌株、*ccpA* 基因缺失株和 *ccpA* 基因回复株的荚膜多糖含量。【结果】Western blot 结果显示 CcpA 蛋白在多种血清型的肺炎链球菌均有表达, CcpA 蛋白可与 *cps* 基因座启动子区域结合, 且呈剂量依赖性; *ccpA* 基因缺失时, 细菌 CPS 含量升高, 回复表达 CcpA 蛋白后, CPS 含量显著降低。【结论】CcpA 是肺炎链球菌中一种保守表达的蛋白, 可通过调节 *cps* 基因座启动子负性调控肺炎链球菌荚膜多糖的表达。

**关键词:** 肺炎链球菌, *ccpA* 基因, 荚膜多糖, 转录调控

**中图分类号:** Q935      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 06-0732-07

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, SP) 是一种常见的致病菌, 可引起肺炎、脑膜炎、败血症等严重感染<sup>[1]</sup>。由于抗生素治疗和疫苗的预防效果并不理想, 其感染的发病率和死亡率较高, 每年全球死于肺炎链球菌感染的人数高达 100 万<sup>[2]</sup>。因此尚需深入研究其感染致病的分子机制, 为新抗菌药和疫苗的研制提供新的靶点。

荚膜多糖 (Capsular polysaccharide, CPS) 是革兰阳性菌表面普遍存在的一种多糖聚合物, 通过共价结合的方式固定于细胞壁外层肽聚糖<sup>[3]</sup>。荚膜

多糖在 SP 逃逸宿主天然免疫系统杀伤中扮演着重要的角色, 是一种非常关键的毒力因子<sup>[4-5]</sup>。从患者体内分离得到的 SP 临床菌株都含有荚膜, 而荚膜缺失菌株的毒力基本丧失<sup>[6]</sup>。因此了解荚膜的调控机制, 可能为控制 SP 的感染提供新的方式或手段。

目前已经清楚, SP 荚膜多糖的生物合成主要受 *cps* 基因座 (*cps* locus) 调控<sup>[7-8]</sup>。相关基因位于 *dexB* 和 *aliA* 基因之间, 形成一个完整转录单位<sup>[9]</sup>。*cps* 基因座上游的启动子调控序列为一段 87 bp 的

**基金项目:** 高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题——肺炎链球菌荚膜多糖 *cps* 基因座转录调控的分子机制研究 (20135503110004)

\* 通信作者。Tel: +86-23-63630440; E-mail: zhangqun198166@163.com

**作者简介:** 王丽滨 (1989 -), 女, 陕西省渭南市人, 初级检验师, 在职硕士研究生, 研究方向为肺炎链球菌的致病机制。E-mail: 380609576@qq.com

收稿日期: 2014-11-20; 修回日期: 2015-01-16

保守序列,包含经典的 -35 区, -10 区序列<sup>[9]</sup>。然而目前尚不清楚有哪些蛋白可与该启动子结合调控其表达<sup>[10]</sup>。

碳代谢调控蛋白 A (catabolite control protein A, CcpA) 是转录调节因子 LacI/GalR 家族中的一个成员,与糖代谢调节相关<sup>[11-13]</sup>。本课题组前期通过 DNA pulldown 实验筛选到 CcpA 可能与肺炎链球菌荚膜多糖 (CPS) 基因座转录调控区域结合,本研究拟通过 EMSA 实验验证这一现象,并观察 CcpA 缺失株及其回复株的荚膜含量变化,来初步研究其对荚膜的调控作用,以更深入的了解肺炎链球菌的致病机制,为其感染疾病的防治提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种与质粒:** NCTC7466 (D39) 购自英国菌种保存中心, TIGR4 购自美国菌种保存中心; CMCC (B) 31436 (血清型 3 型)、31207 (血清型 6B 型)、31693 (血清型 19F 型)、31614 (血清型 14 型)、

31759 (血清型 23F 型)、31011 (血清型 5 型) 等购自中国菌株保藏中心。 *E. coli* BL21 (DE3)、 *E. coli* DH5 $\alpha$  和 pET28a 载体为重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室保存。培养基为 C + Y 半合成培养基<sup>[14]</sup>。

**1.1.2 主要试剂:** PrimeSTAR DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I、 *Xho* I、 *Nhe* I 和 *Not* I、 DNAMarker DL500、DL2000、DL5000 及蛋白质 marker 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; DNA 片段纯化试剂盒购自 Roche 公司; T4 DNA 连接酶购自美国 Progenia 公司; 基因组 DNA 提取试剂盒和化学发光试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 质粒小量提取试剂盒购自美国 Omega 公司; HisBind Column (NiNTA) 树脂和 HRP 标记的山羊抗鼠兔 IgG 购自德国 Novagen 公司; EMSA 试剂盒购自美国 Thermo 公司; 铝佐剂购自美国 Thermo 公司; 兔抗荚膜多糖 91 种血清型抗体购自丹麦血清研究所; IPTG、丙烯酰胺和双丙烯酰胺均购自美国 Sigma 公司; 咪唑、NaCl 和 Tris 碱均为美国 BBI 公司产品; 引物由上海生工合成, 序列见表 1; 其余试剂均为国产分析纯。

表 1. 本研究所用的引物

Table 1. The primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
<i>ccpA</i> F	CGGGATCCATGAATGCAGATGATACAGTA
<i>ccpA</i> R	CCCTCGAG CTATTTACGTTTTTCGTGTTGA
<i>cps</i> F	TACACATCTGCTTCTAAAAATATTGT
<i>cps</i> R	TTAAAACGTCTACTCATGATTAACA
<i>erm</i> F	CCGGGCCAAAATTTGTTTGAT
<i>erm</i> R	AGTCGGCAGCGACTCATAGAAT
<i>ccpA</i> UP F	TTGTAGTGGCGTATTGG
<i>ccpA</i> UP R	ATCAAACAAATTTTGGGCCCGTCTTTTCCTGTCCTTCTA
<i>ccpA</i> DW F	ATTCTATGAGTCGCTGCCGACTAAAAAATCAGGGAATCGAG
<i>ccpA</i> DW R	CAGCATTCAAGGTCATTATC
<i>ccpA</i> iden F	GGTAGCAAGGAGCTAAACCT
<i>ccpA</i> iden R	TAAAGAACTCAACGCCCAA
<i>ccpA-pJW</i> F	CTAGCTAGCATGAATGCAGATGATACAGTAAC
<i>ccpA-pJW</i> R	ATAAGAAATGCGGCCGCTATTTACGTTTTTCGTGTTGA

**1.1.3 实验动物:** SPF 级昆明小鼠, 雌性, 6 - 8 周龄, 体重 18 - 20 g, 购自重庆医科大学动物中心。本研究涉及的动物操作均符合重庆医科大学动物中心管理规定和相关伦理学要求。

### 1.2 CcpA 重组蛋白的表达纯化

将 *ccpA* 基因全长进行 PCR 扩增 (*ccpA* F、*ccpA* R), 通过 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点插入 pET28a 质

粒中, 转化感受态 *E. coli* BL21 (DE3), 挑取阳性单克隆菌落扩大培养, PCR 及双酶切鉴定后, 阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

CcpA 重组蛋白的诱导表达及纯化方法参考文献 [15] 并略作修改。诱导条件为: IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L, 20°C、120 r/min 诱导培养 10 h。纯化条件为: 分别用 20、40、60、80、500 mmol/L 洗脱液进

行目的蛋白的洗脱,10% SDS-PAGE 分析蛋白纯度后超滤浓缩, -80℃ 保存备用。

### 1.3 CcpA 蛋白多克隆抗体的制备

制备方法参考文献 [15] 并略作修改。采用铝佐剂进行制备, 并采用 ELISA 测定多克隆效价。采用 Western blot 分析抗体的特异性和 CcpA 蛋白的保守性表达。

### 1.4 EMSA 验证 CcpA 蛋白与 *cps* 启动子序列的结合

EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) 实验参照试剂盒说明书要求进行, 首先 PCR 扩增生物素标记 *cps* 启动子区域 DNA 探针 (*cps* F、*cps* R), 与 CcpA 蛋白一同加入至反应体系中, 反应体系为: binding buffer 2.0  $\mu$ L, 标记 DNA 探针 1.0  $\mu$ L, 蛋白 0 - 16  $\mu$ L 余下用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu$ L。电泳分离所得的条带转至尼龙膜, 紫外交联 10 min, 加 1:300 稀释的一抗 (试剂盒自带), 洗膜 4 次, 加入底物平衡 buffer, 紫外成像。

### 1.5 *ccpA* 缺失株 D39 $\Delta$ *ccpA* 的构建及鉴定

设计缺失株构建引物 (*ccpA* UP、*ccpA* DW), 采用长臂同源多聚酶链式反应 (LFH-PCR) 技术将 *ccpA* 基因替换为红霉素耐药基因 (*erm*) 后同源重组于肺炎链球菌 D39<sup>[16]</sup>, 在含红霉素 (0.25  $\mu$ g/ml) 的血平板上筛选出 D39 $\Delta$ *ccpA* 缺失株 (*ccpA* iden F、*ccpA* iden R), PCR 及 Western blot 鉴定缺失株。初步鉴定正确后送北京六合华大基因科技股份有限公司测序以进一步明确。

### 1.6 *ccpA* 回复株 (D39 $\Delta$ *ccpA* :: *ccpA*) 的构建与鉴定

首先用引物 (*ccpA*-*pJW*) 扩增 *ccpA* 片段, 将纯化后的 PCR 片段与 *pJW*V25 空载体分别用 *Nhe* I 和 *Not* I 双酶切, 回收目的基因片段和载体片段, 使用 T4 连接酶 16℃ 连接过夜, 将连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 挑取阳性单克隆菌落扩大培养, PCR 鉴定后, 提取质粒, 转化入 D39 $\Delta$ *ccpA* 菌株中, 挑取阳性克隆, PCR 扩增 *ccpA* 片段及 GFP 片段鉴定。

### 1.7 荚膜多糖含量检测

采用 ELISA 法。将 DOC 裂解的对数生长期中期的 D39、D39 $\Delta$ *ccpA* 及 *ccpA* 回复株菌液 (回复株培养时, 加入 150 nmol/L Zn<sup>2+</sup> 诱导 *ccpA* 基因过表达) 包被于 96 孔板上, 4℃ 过夜, 2% BSA 37℃ 封闭 2 h,

洗板 3 次, 加入荚膜多糖一抗 (兔抗荚膜多糖 91 种血清型抗体) (1:2000), 37℃ 孵育 1 h, 洗板 6 次, 加入 HRP 标记羊抗兔二抗 (1:5000), 37℃ 孵育 45 min, 洗板 6 次, TMB 显色 15 min, 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 450 nm 检测吸光度值。

### 1.8 实时荧光定量 PCR

用 C + Y 半合成培养基培养 SP D39、D39 $\Delta$ *ccpA*、*ccpA* 回复株 (D39 $\Delta$ *ccpA* :: *ccpA*) 菌株至对数生长中期, 提取细菌 RNA, 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 16s rRNA、*cps*2A、*cps*2B 为引物, 反应体系为: ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L, cDNA 2.0  $\mu$ L, 引物各 0.5  $\mu$ L, 酶 12.5  $\mu$ L, 共 25  $\mu$ L。反应条件为: 95℃ 变性 10 s, 50℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 20 s, 共 40 个循环。

### 1.9 统计方法

应用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析, 数据的比较采用 t 检验分析, 每组数据至少独立重复检测 3 次, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CcpA 重组蛋白的表达及纯化

SDS-PAGE 图显示 (图 1), 诱导后的重组菌 pET28a :: *ccpA*/BL21 (DE3) 在相对分子质量约 37 kDa 处可见一条明显增粗蛋白条带, 与预期的

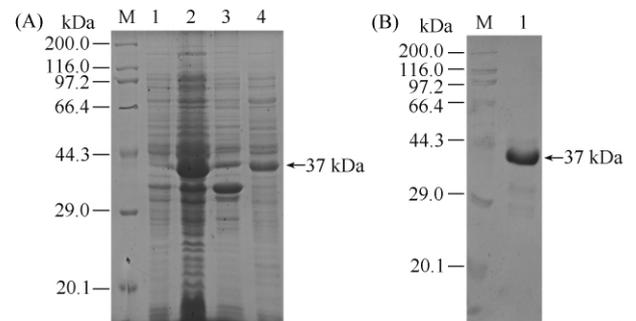


图 1. CcpA 重组蛋白的表达及纯化

Figure 1. The expression and purification of CcpA recombinant protein. A: The expression of CcpA recombinant protein. M, Marker; lane 1, Uninduced pET28a :: *ccpA*/BL21 (DE3) recombinant strain; lane 2, The whole cell lysates of induced pET28a :: *ccpA*/BL21 (DE3) recombinant strain; lane 3, The precipitation of the whole cell lysates of induced pET28a :: *ccpA*/BL21 (DE3) recombinant strain; lane 4, The supernatant of the whole cell lysates of induced pET28a :: *ccpA*/BL21 (DE3) recombinant strain. B: The purification of CcpA recombinant protein. M, Marker; lane 1, The purified CcpA recombinant protein.

CcpA 蛋白大小一致(预期大小),且主要以上清形式存在,其诱导 10 h 后表达趋于稳定。超滤纯化后的 CcpA 蛋白经 SDS-PAGE 分析,可见在相对分子量约 37 kDa 的单一蛋白条带,纯度达 90%,可用于后续的实验。

## 2.2 CcpA 蛋白保守性表达分析

ELISA 检测结果显示,所获抗 CcpA 多克隆抗体的效价达  $1.5 \times 10^6$ (图 2-A)。Western blot 分析显示抗体可与重组 CcpA 蛋白发生特异性的结合,可用于 CcpA 蛋白保守性分析(图 2-B)。

将 8 种不同血清型肺炎链球菌裂解后,Western blot 分析显示(图 2-B),在各血清型的肺炎链球菌中也均与重组 CcpA 一样出现一条相同大小的特异性条带,提示 CcpA 蛋白在不同血清型肺炎链球菌中均有表达,保守性较好。

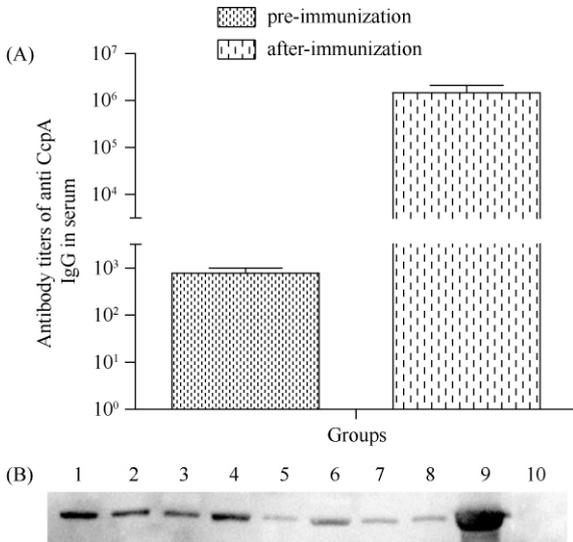


图 2. CcpA 蛋白的保守性分析

Figure 2. The conservation of CcpA protein. A: Antibody titers of anti CcpA IgG in serum. B: The conservation of CcpA protein. Lane 1, Serotype 5 (CMCC (B) 31011); lane 2, Serotype 2 (D39); lane 3, Serotype 3 (CMCC (B) 31436); lane 4, Serotype 4 (TIGR4); lane 5, Serotype 6B (CMCC (B) 31207); lane 6, Serotype 14 (CMCC (B) 31614); lane 7, Serotype 19F (CMCC (B) 31693); lane 8, Serotype 23F (CMCC (B) 31759); lane 9, The purified CcpA protein; 10: The negative control (E. coli BL21).

## 2.3 EMSA 验证 CcpA 蛋白与 CPS 启动子片段的结合

EMSA 结果显示(图 3),CcpA 重组蛋白与生物素标记 CPS 探针(长度为 218 bp 的 *cps* 基因启动子

区)混合后,凝胶电泳显示出有滞后的条带,且随着蛋白浓度的增加,滞后的条带颜色越来越深,位置也逐渐靠后(line 3 - 10),而同时加入非标记的 CPS 探针时,其滞后条带颜色显著变浅(line 1),提示 CcpA 蛋白与 CPS 探针的结合效应被竞争性抑制,上述结果显示 CcpA 重组蛋白可与 *cps* 基因启动子序列发生特异性结合。

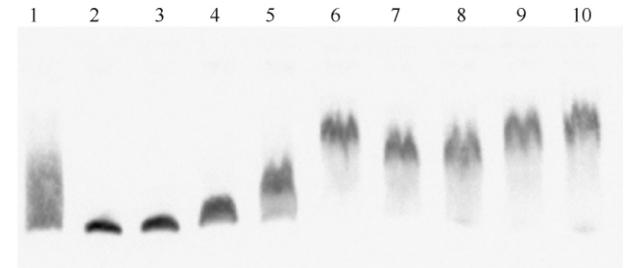


图 3. EMSA 实验验证 CcpA 蛋白与 *cps* 启动子片段的结合

Figure 3. Electrophoretic mobility shift assay of the interaction between CcpA protein and the promoter region of the *cps* locus. Lane 1, CcpA protein 6 μg, labeled *cps* probe 1 μL, unlabeled *cps* probe 8 μL; lane 2, CcpA protein 0 μg, labeled *cps* probe 1 μL; lane 3, CcpA protein 0.6 μg, labeled *cps* probe 1 μL; lane 4, CcpA protein 1.2 μg, labeled *cps* probe 1 μL; lane 5, CcpA protein 3 μg, labeled *cps* probe 1 μL; lane 6, CcpA protein 4.8 μg, labeled *cps* probe 1 μL; lane 7, CcpA protein 6 μg, labeled *cps* probe 1 μL; lane 8, CcpA protein 9 μg, labeled *cps* probe 1 μL; lane 9, CcpA protein 9.6 μg, labeled *cps* probe 1 μL; lane 10, CcpA protein 12 μg, labeled *cps* probe 1 μL.

## 2.4 *ccpA* 基因缺失或回复表达后,细菌 CPS 含量的变化

通过 Western blot 分析鉴定 D39、D39Δ*ccpA* 及回复株中 CcpA 蛋白的表达(图 4-A),采用 ELISA 法检测各菌株的 CPS 含量,并同时检测荚膜合成基因 *cps2A* 和 *cps2B* 的 mRNA 表达量。结果显示,*ccpA* 缺失后,肺炎链球菌 CPS 含量升高,未采用  $Zn^{2+}$  诱导回复株过表达 CcpA 时 [(D39Δ*ccpA* :: *ccpA*) ①、②],CPS 含量与缺失株相似,而通过  $Zn^{2+}$  诱导异位回补过表达 CcpA 后 [(D39Δ*ccpA* :: *ccpA*) ① Zn、(D39Δ*ccpA* :: *ccpA*) ② Zn],CPS 含量显著低于野生菌 D39(图 4-B)。基因 *cps2A* 和 *cps2B* 的 mRNA 表达量与 CPS 含量的变化一致,即 *ccpA* 缺失后,基因 *cps2A* 和 *cps2B* 的 mRNA 表达上调,而异位回补过表达 *ccpA* 后,基因 *cps2A* 和 *cps2B* 的 mRNA 表达则下调,低于野生菌 D39(图 4-C)。

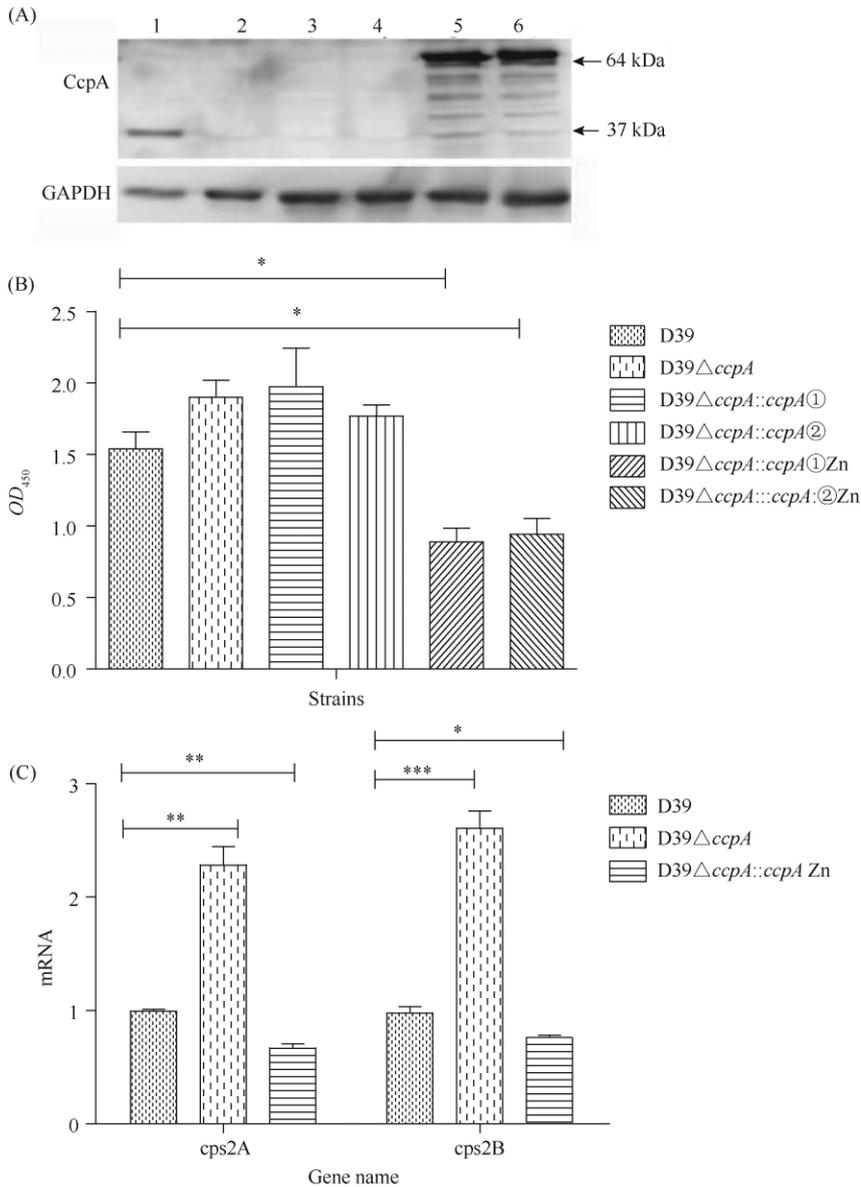


图 4. 荚膜多糖 (CPS) 的检测

Figure 4. The detection of the CPS content. A: Western blot of CcpA expression of D39, D39  $\Delta$  *ccpA* and *ccpA* complemented strains. Lane 1, D39; lane 2, D39  $\Delta$  *ccpA*; lane 3, *ccpA* complemented strain ① without overexpression of CcpA; lane 4, *ccpA* complemented strain ② without overexpression of CcpA; lane 5, *ccpA* complemented strain ① with overexpression of CcpA; lane 6, *ccpA* complemented strain ② with overexpression of CcpA. B: ELISA of CPS content of D39, D39  $\Delta$  *ccpA* and *ccpA* complemented strains. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ . C: Real-time PCR of mRNA of gene *cps2A* and *cps2B* of D39, D39  $\Delta$  *ccpA* and *ccpA* complemented strains. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

### 3 讨论

肺炎链球菌 91 种血清型的荚膜多糖均为 Wzy-依赖型合成途径,由 *cps* 基因座调控。Mavroidi A 等的研究显示,将其上游启动子序列进行替换后,*cps* 基因的表达和荚膜多糖的含量会随着发生改变<sup>[9]</sup>,提示该启动子序列的确能够调控 *cps* 基因座的表达从而调控荚膜多糖的合成,但至今未见关于该启动

子调控机制的研究报道。

CcpA 蛋白是一种与糖代谢调节相关的转录因子,参与了肺炎链球菌 D39 菌株基因组中至少 19% 的基因表达调控;当 *ccpA* 缺失时,多达 79 种毒力因子的转录均受影响,其中大概有 35 种毒力因子可受 CcpA 直接调控<sup>[13]</sup>。但文献所报道的 CcpA 直接调控基因中并未包含 *cps* 基因。而本研究结果显示,转录因子 CcpA 蛋白确实能与 *cps* 基因座上游启动

子序列发生特异性的结合,提示 CcpA 可能对肺炎链球菌 cps 基因具有调控作用。进一步的研究证实了这一推测:我们将 ccpA 基因缺失后,肺炎链球菌 cps 基因的 mRNA 表达显著升高,而将 ccpA 基因异位过表达后,cps 基因的 mRNA 表达也显著下调,同时荚膜多糖 CPS 的含量变化与 cps 基因的表达变化相一致。这些结果证实了 CcpA 对肺炎链球菌 CPS 合成的负调控作用,其机制为通过与 cps 基因座启动子结合,下调 cps 基因的表达,从而使 CPS 的合成量降低。

以往的研究显示,CcpA 与调控基因的启动子序列结合的保守序列为 cre 序列<sup>[11-12,17-18]</sup>,通过序列比对发现,cps 基因座启动子序列-10 区也存在这个保守序列,然而,我们将该保守序列缺失后,发现截断序列仍能与 CcpA 结合,其结合能力并无显著下降,提示在 cps 基因座启动子序列中存在有新的结合基序可与 CcpA 结合。因此,我们后续拟进一步采用 DNase I 足迹实验、突变序列结合实验等寻找 CcpA 在 cps 基因座启动子中的新结合位点。

文献已证明 CcpA 对基因的调控受不同糖类别及糖浓度影响<sup>[11,13]</sup>,且 CcpA 对  $\beta$  半乳糖苷酶代谢的调控在不同血清型中存在差异。如在葡萄糖和乳糖存在的条件下,2 型菌株 D39 的 ccpA 缺失株  $\beta$  半乳糖苷酶活性升高,而 4 型菌株 TIGR4 的 ccpA 缺失株  $\beta$  半乳糖苷酶活性则是降低的<sup>[11]</sup>。肺炎链球菌在不同宿主环境中可表达不同的荚膜多糖量,且这一调控可能是通过对 cps 基因表达的调控而实现的。如原本荚膜多糖丰富的 SP 菌株在直接接触呼吸道上皮细胞后其荚膜多糖量显著减少<sup>[19]</sup>。而感染小鼠血液中的 cps 基因 mRNA 的表达量大约是体外培养菌株的 4 倍<sup>[20]</sup>。那么宿主相关因素对细菌 CPS 的调控是否是通过 CcpA 对 cps 基因表达调控而实现的呢? 其主要的影响因素也是葡萄糖等各种糖类吗? 影响的结果在不同血清型中是否一样呢? 这都是尚待解决的问题。这些问题的解决可明确宿主环境因素调控荚膜的机制,为肺炎链球菌的治疗药物或疫苗的研发提供新的作用靶点。

综上所述,本研究首次报道了一个可调控肺炎链球菌荚膜多糖合成的调控因子,并初步阐明了其调控的机制,为肺炎链球菌的致病机制提供了新的实验依据。

## 参考文献

[1] Marks LR, Davidson BA, Knight PR, Hakansson AP.

- Interkingdom signaling induces *Streptococcus pneumoniae* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to disease. *MBio*, 2013, 4(4):e00438-13.
- [2] Sui Z, Zhou W, Yao K, Liu L, Zhang G, Yang Y, Feng J. Complete genome sequence of *Streptococcus pneumoniae* strain A026, a clinical multidrug-resistant isolate carrying Tn2010. *Genome Announc*, 2013,1(6):e01034-13.
- [3] Sorensen UBS, Blom J, Birch-Andersen A, Henrichsen J. Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infectinon and Immunity*, 1988, 56(8):1890-1896.
- [4] Llull D, Lopez R, Garcia E. Genetic bases and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenic streptococci. *Current Molecular Medicine*, 2001, 1: 475-491.
- [5] Magee AD, Yother J. Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infectinon and Immunity*, 2001, 69(6):3755-3761.
- [6] Weinberger DM, Trzcinski K, Lu YJ, Bogaert D, Brandes A, Galagan J, Anderson PW, Malley R, Lipsitch M. Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. *PLoS Pathogens*, 2009, 5: e1000476.
- [7] Hardy GG, Caimano MJ, Yother J. Capsule biosynthesis and basic metabolism in *Streptococcus pneumoniae* are linked through the cellular phosphoglucomutase. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(7):1854-1863.
- [8] Ventura CL, Cartee RT, Forsee WT, Yother J. Control of capsular polysaccharide chain length by UDP-sugar substrate concentrations in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(3):723-733.
- [9] Mavroidi A, Aanensen DM, Godoy D, Skovsted L, Kalltoft MS, Reeves PR, Bentley SD, Spratt BG. Genetic relatedness of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(21):7841-7855.
- [10] Moscoso M, Garcia E. Transcriptional regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae*: a bioinformatic analysis. *DNA Research*, 2009,16:177-186.
- [11] Iyer R, Baliga NS, Camilli A. Catabolite control protein A (CcpA) contributes to virulence and regulation of sugar metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 2005,187(24):8340-8349.
- [12] Kaufman GE, Yother J. CcpA-dependent and -independent control of beta-galactosidase expression in *Streptococcus pneumoniae* occurs via regulation of an upstream phosphotransferase system-encoding operon. *Journal of*

- Bacteriology, 2007, 189 (14) : 5183-5192.
- [13] Carvalho SM, Kloosterman TG, Kuipers OP, Neves AR. CcpA ensures optimal metabolic fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One*, 2011, 6 (10) : e26707.
- [14] Martin B, Garcia P, Castanie MP, Claverys JP. The recA gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Molecular Microbiology*, 1995, 15 : 367-379.
- [15] Wang Z, Wang JM, Ma F, Zhang S, Huang YS, Zhang XM. Protein expression localization, conservation analysis and biological functions of SpxB in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Third Military Medical University*, 2014, 3 (13) : 1486-1491. (in Chinese)  
王哲, 王建敏, 马峰, 张帅, 黄远帅, 张雪梅. 肺炎链球菌 SpxB 蛋白的细胞表达定位、保守性分析及其生物学功能初探. 第三军医大学学报, 2014, 36 (14) : 1486-1491.
- [16] Piotrowski A, Burghout P, and Morrison DA. Spr1630 is responsible for the lethality of clpX mutations in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191 (15) : 4888-4895.
- [17] Ishii H, Tanaka T, Ogura M. The *Bacillus subtilis* response regulator gene *degU* is positively regulated by CcpA and by catabolite-repressed synthesis of ClpC. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195 (2) : 193-201.
- [18] Suarez CA, Blancato VS, Poncet S, Deutscher J, Magni C. CcpA represses the expression of the divergent *cit* operons of *Enterococcus faecalis* through multiple *cre* sites. *BioMedCentral Micrology*, 2011, 11 : 227.
- [19] Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Muller E, Rohde M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infectinon and Immunity*, 2005, 73 (8) : 4653-4667.
- [20] Weiser JN, Bae D, Epino H, Gordon SB, Kapoor M, Zenewicz LA, Shchetov M. Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infectinon and Immunity*, 2001, 69 (9) : 5430-5439.

## Regulation effect of CcpA protein on the biosynthesis of capsular polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae*

Libin Wang<sup>1</sup>, Hongmei Xu<sup>1</sup>, Kaifeng Wu<sup>2</sup>, Yuqiang Zheng<sup>1</sup>, Jianmin Wang<sup>1</sup>, Feng Ma<sup>1</sup>, Xuemei Zhang<sup>1</sup>, Yibing Yin<sup>1</sup>, Qun Zhang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Diagnostic Medicine Designated by the Ministry of Education, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, The Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563002, Guizhou Province, China

**Abstract:** [Objective] We studied the regulation effect of glycometabolic protein, catabolite control protein A (CcpA), on the biosynthesis of capsular polysaccharide (CPS) in *Streptococcus pneumoniae*. [Methods] His-tagged CcpA protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography. The anti-CcpA serum was obtained from immunized mice and the antibody titer was determined by ELISA. The conservation of CcpA was determined by Western blotting. In addition, binding of CcpA protein to the promoter region of *cps* locus was verified by EMSA. The amount of capsular polysaccharide was determined by ELISA and compared among wild type D39 strain, *ccpA* mutant and the complement strains. [Results] CcpA protein was conserved in different pneumococcal serotypes included in this study. EMSA assay revealed that CcpA protein could bind the promoter region of the *cps* locus in a dose-dependent manner. The absence of *ccpA* gene led to an increased expression of capsular polysaccharide, and complement expression of CcpA protein significantly reduced the amount of capsular polysaccharide. [Conclusion] CcpA is conserved in *Streptococcus pneumoniae*, which plays a role in regulation of the expression of the capsular polysaccharide.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, gene *ccpA*, capsular polysaccharide, transcription regulation

(本文责编:王晋芳)