

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (6) :780 - 787; 4 June 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140488

肺炎链球菌 *cps* 操纵子的启动子序列点突变可导致细菌荚膜缺失

王建敏¹, 徐绣宇², 马峰³, 徐红梅¹, 王丽滨¹, 邢燕³, 粟玉凤¹, 张雪梅^{1*}

¹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

²重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016

³重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400016

摘要:【目的】明确肺炎链球菌荚膜多糖合成操纵子的启动子序列出现的点突变 313713 T→C 是否可导致细菌荚膜缺失。【方法】Western blot 检测肺炎链球菌突变株 SPY1 (NC_008533.1 313713 T→C) 荚膜多糖含量; 实时定量荧光 PCR 分析荚膜多糖合成基因 *cps2A*、*cps2B*、*cps2C* 以及 *cps2D* 的表达量; 构建重组质粒 pEVP3-*cps* promoter^{D39} 和 pEVP3-*cps* promoter^{SPY1}, 分别转化 D39 和 SPY1 菌株, 通过 β-半乳糖苷酶活性检测来验证转入的启动子序列对细菌荚膜合成的影响, 并通过电镜观察荚膜结构和荚膜肿胀试验进一步验证。【结果】肺炎链球菌 SPY1 的荚膜多糖含量较野生型显著下降, 其相关基因 *cps2A*、*cps2B*、*cps2C* 以及 *cps2D* 的表达量较野生型 D39 均显著降低; 与 D39-pEVP3-*cps* promoter^{D39} 对比, D39-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1} 的 β-半乳糖苷酶活性下降了 76%, 与 SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{D39} 相比, SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1} 的 β-半乳糖苷酶活性下降了约 79%; 电镜结果显示, 重组 SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{D39} 荚膜可恢复至野生型水平, 并且重组 D39-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1} (NC_008533.1 313713 T→C) 荚膜肿胀试验呈阴性。【结论】荚膜多糖合成操纵子的启动子序列点突变 313713 T→C 可导致荚膜多糖合成基因表达显著下调, 从而引起菌株 SPY1 的荚膜显著减少甚至缺失。

关键词:肺炎链球菌, 荚膜, 点突变

中图分类号: R37 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 06-0780-08

革兰阳性细菌肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, *S. pneumoniae*), 是一种人上呼吸道的共生菌。它常引起中耳炎、鼻窦炎、社区获得性肺炎等, 严重者可引起菌血症、脑膜炎等, 常伴有高发病率和死亡率^[1]。荚膜是肺炎链球菌重要的毒力因

子, 在肺炎链球菌的致病过程中发挥重要作用^[2]。从人体血液、脑脊液等样本中分离得到的肺炎链球菌都含有荚膜, 通常流行血清型的菌株的荚膜相对较厚, 而荚膜缺失菌株毒力基本丧失^[3]。

荚膜的合成是一个复杂的过程, 目前的研究显

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 (20135503110004)

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

作者简介: 王建敏 (1986 -), 女, 四川内江, 初级检验师, 硕士研究生, 研究方向为肺炎链球菌致病机制及蛋白质相互作用。E-mail: 309936877@qq.com

收稿日期: 2014-10-13; 修回日期: 2015-01-05

示,肺炎链球菌荚膜合成主要受荚膜多糖合成(capsular polysaccharide biosynthesis, *cps*)操纵子调控。其中血清型3型和37型为合成酶依赖的荚膜多糖合成途径;其余91种血清型均为Wzy-依赖的荚膜多糖合成途径,相关基因位于*dexB*和*aliA*基因之间,构成一个完整转录单位,受上游启动子调控^[4]。该操纵子的启动子序列由87 bp寡核苷酸片段构成,包含经典的-35区和-10区。研究人员发现,采用不同效率的启动子序列替代该序列后,*cps*基因的表达水平可发生改变,并表现出相应的荚膜多糖含量的改变^[5],提示,该启动子序列确实可影响细菌荚膜的合成,但目前尚未见该启动子本身序列的突变对肺炎链球菌荚膜合成影响的报道。

本课题组前期在构建肺炎链球菌D39(血清型2型)基因SPD_1672缺陷菌的实验过程中获得了一株荚膜缺失的突变株,命名为SPY1^[6]。研究发现基因SPD_1672可影响细菌磷壁酸的合成,但其基因缺陷并不能引起细菌荚膜的改变^[7]。为了探寻该菌株荚膜缺失的原因,我们对其进行了全基因组测序。测序结果提示SPY1的*cps*操纵子中*cps*基因与野生D39完全一致,只是其启动子序列中存在一个点突变313713 T→C(NC_008533.1),位于-10区,那么这个点突变是否就是导致SPY1荚膜缺失的原因呢?为了验证这一猜想,我们设计了多个实验从基因表达水平和荚膜含量表型方面进行了详细分析,最终验证了该突变可导致荚膜合成基因表达显著下调而引起细菌荚膜多糖合成量显著下降,本研究结果为肺炎链球菌荚膜合成的调控提供了新的实验证据。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

肺炎链球菌标准菌株D39(NCTC 7466,血清型2型)购买于欧洲菌种保存中心;2型肺炎链球菌无荚膜突变株R6(ATCC BAA-255)购买于美国模式培养物保存中心;2型肺炎链球菌突变株SPY1(D39 SPD_1672::Erm,313713 T→C)由本实验室在D39传代过程中获得并保存,它的表型特征是:荚膜以及磷壁酸表达量较野生型明显降低;2型肺炎链球菌缺陷株D39 ΔCPS-1672(D39 *cps*2A-2H::Tet,SPD_16725Erm)为本课题组前期构建,它的表型特

征与SPY1基本一致。

大肠杆菌BL21由本实验室保存,质粒pEVP3(Cm^r,*lacZ*)由美国加州大学Morrison教授惠赠^[8]。质粒pEVP3的多克隆位点位于报告基因*lacZ*(编码β-半乳糖苷酶)的上游,由于*lacZ*缺乏启动子,LacZ则随插入基因的表达而同时表达,或在插入启动子的调控下启动自身表达。因此通过检测β-半乳糖苷酶的活性,即可反映插入基因的表达水平或插入启动子序列的调控能力。

1.2 主要实验试剂

DNA纯化试剂盒购自美国罗氏公司;质粒抽提试剂盒购自美国Omega公司;PCR试剂、高保真DNA聚合酶、rTaq酶、T4连接酶、限制性内切酶购买于宝生物(大连)公司;配制Western blot所需试剂、脱氧胆酸盐购自上海生工生物有限公司;RNase A、蛋白酶K、溶菌酶、酵母提取物、胰蛋白酶购买于美国Sigma公司;抗2型肺炎链球菌荚膜抗体和omni荚膜抗体购买于丹麦血清研究所;β-半乳糖苷酶活性检测试剂盒购自碧云天生物技术研究;血平板购买于重庆庞通公司。

1.3 肺炎链球菌的培养

将肺炎链球菌D39、R6、SPY1和D39 ΔCPS-1672接种于C+Y培养基中^[9],置37℃,5% CO₂培养箱中培养至OD₆₂₀为0.4-0.5。

1.4 Western blot检测荚膜多糖含量

培养至OD₆₂₀为0.4-0.5的肺炎链球菌D39、R6、SPY1和D39 ΔCPS-1672菌液各30 mL,离心集菌,裂解产物经8% SDS-PAGE分离后,转移至聚偏二氟乙烯膜上,5%的BSA 37℃封闭2 h;加入兔抗2型肺炎链球菌荚膜多糖一抗(1:2000稀释),4℃孵育过夜;0.05% TBST洗膜4次,每次15 min;加入HRP标记的羊抗兔二抗(1:5000稀释),37℃孵育45 min;0.05% TBST洗膜4次,每次15 min;利用Enlight™ Western 特异发光检测试剂盒化学发光成像分析。

1.5 实时定量荧光PCR检测荚膜多糖合成基因表达量

Trizol法分别提取肺炎链球菌D39和SPY1的细菌总RNA,以其为模板,Oligo dT为引物,逆转录制备D39和SPY1的cDNA。反应条件为:37℃ 15 min,85℃ 5 s。利用所制备的cDNA为模板,实时定量荧光PCR分别扩增16S rRNA、

cps2A、*cps2B*、*cps2C*、*cps2D*，并以神经氨酸酶 *nanA*、胆碱结合蛋白 *A cbpA* 和自溶酶 *A lytA* 作为对照参考基因。所使用引物序列见表 1。反应条件：95℃ 30 s；95℃ 10 s，55℃ 30 s，72℃ 10 s，共 40 个循环；72℃ 10 s。

表 1. PCR 引物序列

Table 1. The primer sequences for PCR

Target Gene	Sequence of Primers (5'→3')
16S rRNA	F:GTAGTCCACGCTGAAACGATGATG R:CTGTCCCGAAGGAAAACCTATCT
<i>cps2A</i>	F:CGTCAACCGAAGCACTG R:GATCCATCCGACCTGTCC
<i>cps2B</i>	F:TCGTTATGCCTTGATAGAAT R:ATTTACTTGCGTGAACAGC
<i>cps2C</i>	F:TTTGCAGGCAGGATCTTATC R:GGCTTCTCTGGCTGTTAT
<i>cps2D</i>	F:AAAGCAAGGATAAGATTACAGG R:TTTACGCAAGGTTTCAAGCA
<i>nanA</i>	F:TACCAGTCTCTGTGGCGGGC R:GCTGGCTCTTCGCCGGATGT
<i>cbpA</i>	F:GCTTGACTCAACAGCAACCCGC R:TGGAGCCATCCTGTCCGCAT
<i>lytA</i>	F:CCTCAAGTCGGCGTCAACCA R:TTCACCGCCCGCAACGTC
<i>cps promoter</i>	F:GAAGATCTAAGAAATCCTCTGATATCTTCTCC R:TCCCCGGGCATGATTAACACCTATACATTGAAC
<i>cps promoter-cps2A</i>	F:AAAAAGATTATACACATTTGTGTAC R:TCTACCCTCCATCACATCCTGTATA

F: Forward; R: Reverse.

1.6 PCR 扩增目的片段

采用酚氯仿法提取肺炎链球菌 D39 和 SPY1 细菌基因组 DNA。以所提基因组 DNA 为模板，Peps promoter F 和 Peps promoter R 为引物，PCR 特异性扩增包含 *cps* 启动子序列的目的片段 *cps promoter* (NC_008533.1 312985..313722, 约 750 bp)，引物序列见表 1。反应条件：98℃ 10 s，55℃ 15 s，72℃ 60 s，共 30 个循环，72℃ 10 min。PCR 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.7 构建重组质粒

纯化回收的 PCR 产物和 *pEVP3* 空质粒分别用 *Sma* I 和 *Bgl* II 双酶切，纯化后回收目的基因片段和载体片段，T4 连接酶 16℃ 连接 13 h。连接产物转化大肠杆菌 BL21 感受态，筛选阳性克隆，提质粒进

行双酶切及测序鉴定，鉴定正确的质粒命名为：*pEVP3-cps promoter*^{D39} 和 *pEVP3-cps promoter*^{SPY1}。

1.8 β-半乳糖苷酶活性检测

参照试剂盒说明书进行。收集 0.5 mL 对数生长早期的 D39-*pEVP3-cps promoter*^{D39}、D39-*pEVP3-cps promoter*^{SPY1}、SPY1-*pEVP3-cps promoter*^{D39} 和 SPY1-*pEVP3-cps promoter*^{SPY1} 菌液，菌体沉淀用 0.5 mL 含 0.1% Triton 的 PBS 溶液室温作用 15 min 裂解细菌；细菌裂解液加入 96 孔板，每孔 50 μL，再加入 50 μL β-半乳糖苷酶检测试剂，混匀，37℃ 避光反应 30 min；加入 150 μL β-半乳糖苷酶反应终止液终止反应，于 420 nm 测定吸光度。

1.9 透射电镜观察肺炎链球菌的荚膜结构

D39、R6、SPY1 和 SPY1-*pEVP3-cps promoter*^{D39} 菌株，分别接种于哥伦比亚血平板，37℃，5% CO₂ 孵箱中培养 12 h，收集细菌，4℃，9000 × g 离心 10 min，弃上清后缓慢加入 1.3 mL 4% 戊二醛固定液。送重庆医科大学电镜中心进行透射电镜检查。

1.10 荚膜肿胀实验

D39、R6、SPY1、D39-*pEVP3-cps promoter*^{D39} 和 D39-*pEVP3-cps promoter*^{SPY1} 菌株，分别接种于哥伦比亚血平板，37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 18 h。载玻片上滴加 3 μL 生理盐水，无菌接种环分别挑取以上菌株样本 3-5 个菌落，均匀涂布。滴加 3 μL 抗 91 种血清型肺炎链球菌荚膜多糖的抗血清 (omni serum)，与载玻片上的细菌悬液涂布均匀。反应 5 min 后，加盖盖玻片，油镜下观察各株细菌的荚膜肿胀情况。

1.11 *cps promoter-cps2A* 长片段测序鉴定

D39、R6、SPY1、D39-*pEVP3-cps promoter*^{D39} 和 D39-*pEVP3-cps promoter*^{SPY1} 菌株，分别接种于哥伦比亚血平板，37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 18 h。挑取菌落进行菌液 PCR。引物为 *Pcps promoter-cps2A* F 和 *Pcps promoter-cps2A* R，特异性扩增各菌株基因组中 *cps promoter* 和 *cps2A* 的长片段 (NC_008533.1 313494..315186, 1693 bp)。条件如下：98℃ 10 s，55℃ 15 s，72℃ 1 min 30 s，共 30 个循环，72℃ 10 min。PCR 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定正确后，送华大基因公司测序进一步鉴定。

1.12 统计学分析

数据统计分析和作图采用 Graph Pad Prism 5.01 软件，数据采用非配对 *t* 检验统计分析。以 *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 肺炎链球菌突变株 SPY1 的荚膜多糖含量

为验证我们前期研究所发现的 SPY1 的荚膜缺陷表型,我们利用 Western blot 分析了 SPY1 这一突变菌的荚膜多糖表达量。如图 1 所示,与野生型相比,SPY1 的荚膜多糖表达量显著下降,且以小分子组分为主;与无荚膜突变株 R6 相比,荚膜多糖的表达量无显著性差异。同时,SPY1 的荚膜多糖表达量也与我们前期构建的荚膜缺陷株 D39 Δ CPS-4672 无显著性差异。

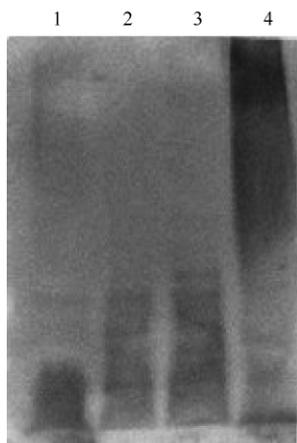


图 1. 不同菌株荚膜多糖表达量的 Western-blot 检测

Figure 1. Detection of capsular polysaccharides in different strains by Western blotting. Lane 1: R6; lane 2: SPY1; lane 3: D39 Δ CPS-4672; lane 4: D39.

2.2 SPY1 的荚膜多糖合成基因表达量分析

我们通过测序得知,*cps* 操纵子的启动子序列存在点突变 313713 T \rightarrow C,为分析该突变能否降低所在序列的调控能力,影响下游 *cps* 基因的表达,我们检测了 SPY1 的荚膜多糖合成基因 *cps2A*、*cps2B*、*cps2C* 以及 *cps2D* 的 mRNA 水平。如图 2 所示,SPY1 的 *cps2A*、*cps2B*、*cps2C* 以及 *cps2D* 的 mRNA 水平均显著降低,约为野生型水平的 15%;而与荚膜合成无关的基因 *cbpA*、*lytA* 和 *nanA*,其 mRNA 表达量与野生型无明显差异。这些结果提示,*cps* 操纵子的启动子序列点突变 313713 T \rightarrow C 可能引起了下游 *cps* 基因表达的下调。

2.3 SPY1 的 *cps* 操纵子的启动子序列点突变 313713 T \rightarrow C 导致 *cps* 基因表达量下调

为验证 *cps* 操纵子的启动子序列点突变

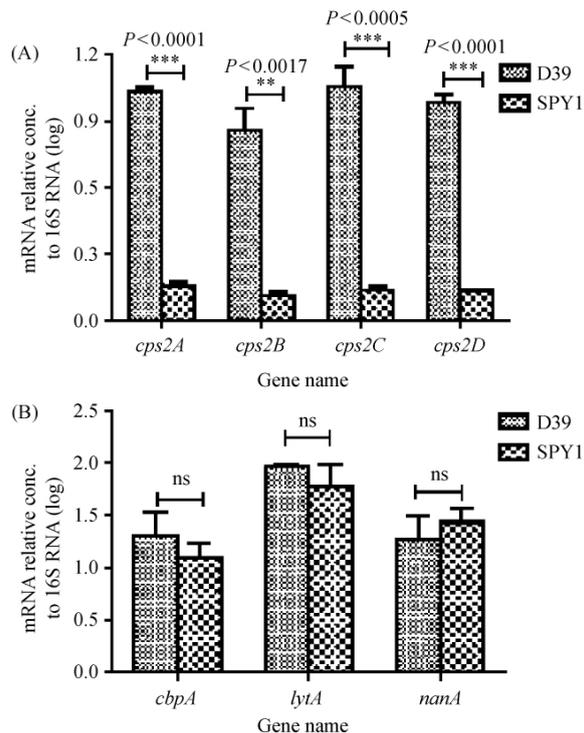


图 2. SPY1 与 D39 菌株的 *cps2A*、*cps2B*、*cps2C* 以及 *cps2D* 差异表达的实时定量荧光 PCR 分析

Figure 2. Detection of differential expression of *cps* genes between wild strain D39 and mutant strain SPY1 by real-time quantitative PCR. A: Real-time quantitative PCR of *cps2A*, *cps2B*, *cps2C* and *cps2D*; B: Real-time quantitative PCR of *cbpA*, *lytA* and *nanA*.

313713 T \rightarrow C 可导致 *cps* 表达量下降,我们选用质粒 pEVP3 中的 *lacZ* 作为报告基因对 SPY1 的 *cps* 启动子的调控能力进行分析。

首先,PCR 分别扩增 D39 和 SPY1 的 *cps* 启动子序列片段(图 3-A),双酶切后分别连接质粒 pEVP3,并转化大肠杆菌 BL21 感受态。提取质粒经双酶切鉴定(图 3-B),证实目的片段已正确插入 *lacZ* 的上游,进一步测序证实成功构建重组质粒 pEVP3-*cps* promoter^{D39}和 pEVP3-*cps* promoter^{SPY1}(NC_008533.1 313713 T \rightarrow C)。将重组质粒分别转化 SPY1 和 D39 菌株,得到重组 SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{D39}、SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1}和 D39-pEVP3-*cps* promoter^{D39}、D39-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1}菌株,并通过测序证实转入的启动子序列正确。

如图 4-A 所示,与 SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{D39}相比,SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1}的 β -半乳糖苷酶活性显著下降约 79%,且 SPY1-pEVP3-*cps*

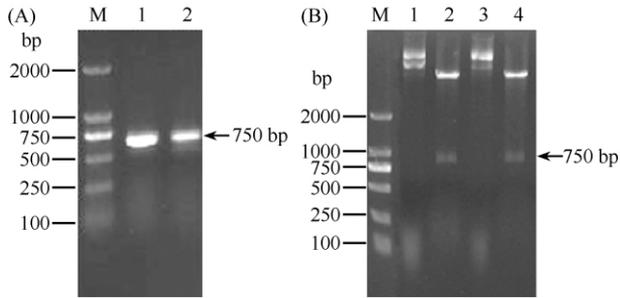


图 3. *cps* 操纵子的启动子序列片段扩增和重组质粒双酶切鉴定

Figure 3. Amplification of fragment *cps* promoter (A) and double digestion of recombinant plasmid (B). A: Lane 1: *cps* promoter^{D39}; Lane 2: *cps* promoter^{SPY1}; M: DL2000 DNA Marker; B: Lane 1: pEVP3-*cps* promoter^{D39}; lane 2: pEVP3-*cps* promoter^{D39} digested with *Sma* I and *Bgl* II; lane 3: pEVP3-*cps* promoter^{SPY1}; lane 4: pEVP3-*cps* promoter^{SPY1} digested with *Sma* I and *Bgl* II; M: DL2000 DNA Marker.

promoter^{D39} 的 β -半乳糖苷酶活性与 D39-pEVP3-*cps* promoter^{D39} 基本一致。

我们同时比较了 D39-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1} 和 D39-pEVP3-*cps* promoter^{D39} 菌株中 β -半乳糖苷酶活性,由图 4-B 可知,前者的 β -半乳糖苷酶活性较后者显著下降约 76%。

这些结果再次表明,点突变 313713 T→C 会引起 *cps* 启动子序列调控能力下降。

2.4 SPY1 的 *cps* 操纵子的启动子序列点突变导致荚膜缺失

cps 操纵子的启动子序列点突变 313713 T→C 导致 *cps* 表达量下降是否就是该菌株荚膜缺失的原因呢? 我们首先通过透射电镜对 SPY1 及 SPY1-

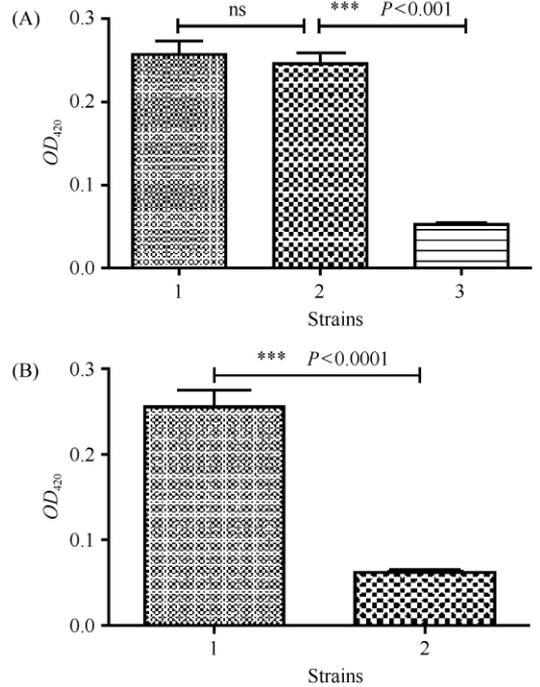


图 4. 不同重组质粒转染菌株的 β -半乳糖苷酶活性检测

Figure 4. Detection of β -galactosidase activities in recombinant vector-transformed strains. A: 1: D39-pEVP3-*cps* promoter^{D39}; 2: SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{D39}; 3: SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1}; B: 1: D39-pEVP3-*cps* promoter^{D39}; 2: D39-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1}.

pEVP3-*cps* promoter^{D39} 的荚膜结构进行了观察。如图 5 所示,SPY1 菌株荚膜缺失,与 R6 菌株类似;而 SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{D39} 菌株荚膜得以恢复,与野生型 D39 菌株水平相当。由此可见,*cps* 操纵子的启动子序列点突变 313713 T→C 会导致荚膜缺失。

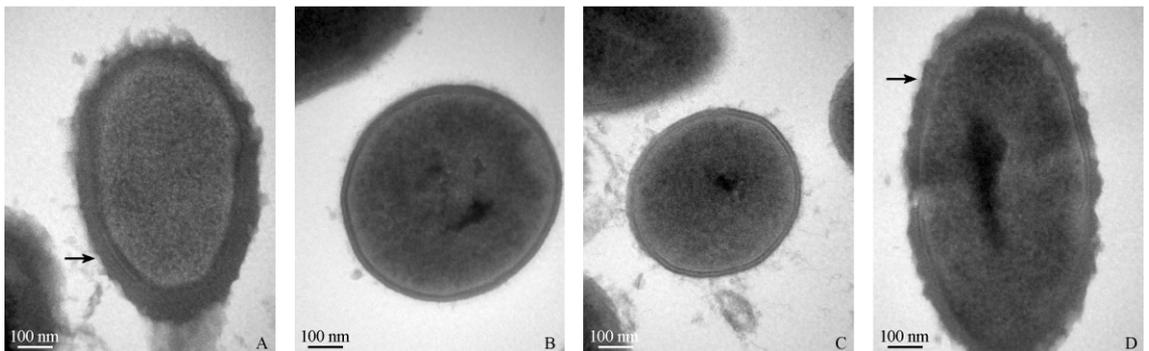


图 5. SPY1 及 SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1} 菌株的透射电镜图 (12000 ×)

Figure 5. Transmission electron micrographs of SPY1 and SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1} strains (12000 ×). A: D39; B: R6; C: SPY1; D: SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{D39}.

为了进一步确证这一结果,我们采用抗荚膜多糖的抗体进行了荚膜肿胀实验。结果如图 6 所示,在油镜下观察,D39- ρ EVP3-*cps* promoter^{SPY1}菌株呈现两种不同的表型,一种菌体较小,多数单个或成对排列,较少呈长链状,菌体周围无透明荚膜肿胀层,荚膜肿胀实验阴性(图 6-F),与无荚膜菌株 R6 类似(图 6-B);而另一种菌体较大,多数呈长链状,菌体周围可见明显透明荚膜肿胀层,荚膜肿胀实验阳性(图 6-E),与野生型 D39 类似(图 6-A)。我们利用

特异性的引物扩增 D39- ρ EVP3-*cps* promoter^{SPY1}菌株基因组中 *cps* promoter 和 *cps2A* 片段,测序证实荚膜肿胀实验呈阴性的菌株其 *cps2A* 上游启动子序列存在点突变 313713 T→C,而荚膜肿胀实验呈阳性的菌株序列与野生型一致,没有发生突变。这些结果进一步证明了 SPY1 的荚膜显著减少甚至缺失的确是由 *cps* 操纵子的启动子序列点突变 313713 T→C 造成的。

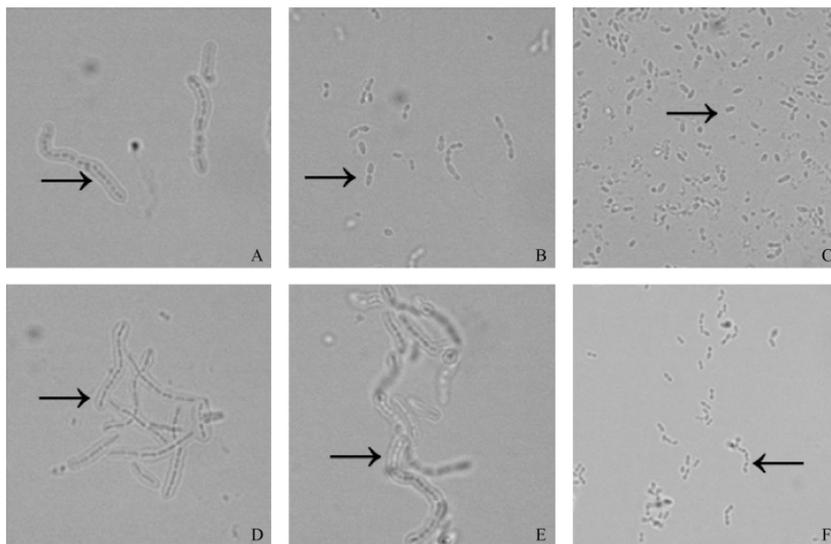


图 6. 各株肺炎链球菌的荚膜肿胀结果 (1000 ×)

Figure 6. Neufeld test of different pneumococcal strains (1000 ×). A: D39; B: R6; C: SPY1; D: D39- ρ EVP3-*cps* promoter^{D39}; E: D39- ρ EVP3-*cps* promoter^{SPY1} (NC_008533.1 313713 T→T); F: D39- ρ EVP3-*cps* promoter^{SPY1} (NC_008533.1 313713 T→C).

3 讨论

荚膜作为肺炎链球菌最主要的毒力因子,其主要成分是荚膜多糖,由荚膜多糖合成操纵子合成。荚膜多糖的合成调节是一个由调节蛋白相互作用的复杂过程,多发生在转录水平^[10]。早期研究发现,*cps* 操纵子可能由 *cpsA* 上游的单个启动子转录形成,并且在 91 种采用 Wzy-依赖途径合成荚膜多糖的血清型中,*cps* 操纵子的前四个基因即 *cpsA-D* 具有高度保守性且可调控荚膜水平^[11-12]。肺炎链球菌可能通过 *cpsA-D* 所编码的多蛋白磷酸化系统在翻译后水平调控荚膜的总量。有文献报道在肺炎链球菌 R6、血清型 33D、18C 和 6B 中均发现 *cps* 操纵子上游调控序列中存在不同位点的点突变,并猜测这些点突变都可能降低 *cps* 调控序列的启动能力,

影响 CPS 的表达合成量,但并无实验证据证实^[13-14]。

我们在实验过程中意外地获得了一株荚膜缺失的菌株 SPY1,该菌株来源于荚膜含量较高的 D39 菌株,且并未对其进行荚膜编码序列的改造,这引起了我们的极大关注,推测其荚膜的缺失可能存在新的机制。因此,我们将该菌株进行了全基因组测序,结果显示,其荚膜编码序列并无任何突变,但在 *cps* 启动子序列中存在点突变 313713 T→C,这提示该突变很可能导致了细菌荚膜缺失的表型发生。我们首先通过实时定量荧光 PCR 检测 SPY1 菌株的荚膜合成相关基因 *cps2A-D* 的表达量,发现较野生型均显著降低;利用报告基因 *lacZ* 分析发现,该菌株 *cps* 启动子序列转录活性较野生型明显降低;进一步通过扫描电镜观察荚膜的结构和荚膜肿胀实验证实该点突变确实可导致细菌荚膜缺失。这些结果提示该点

突变可引起荚膜合成基因的表达显著下调,从而导致细菌的荚膜缺失。-10 区为 RNA 聚合酶的牢固结合位点,主要负责转录的精确起始,并且其碱基序列还可通过影响开放性启动子复合物的形成速度而控制转录的强度。本文研究的点突变位于 -10 区,很有可能影响了 RNA 聚合酶的结合,使得该启动子的下游基因转录活性下降,这有待进一步的实验证实。

cps 操纵子究竟受到哪些调控子的调节? 这些调控子以何种方式调节荚膜多糖的表达并影响毒力? 目前并不清楚。生物信息学分析显示,*cps* 启动子区存在与调控子 ComX1、RegM、CopY、RitR 结合位点相似的基序,但尚缺乏相关直接实验证据支持^[14]。另有学者发现转录因子 GlnR 的结合位点也与 *cps* 启动子序列有相似性,然而对比分析野生菌和其缺陷菌的 *cps* 转录水平,结果显示二者并无显著差异^[15]。我们通过实验证明 *cps* 启动子序列确实具有调控 *cps* 基因的作用,为后续通过该序列筛查其调控蛋白分子提供了坚实的基础。同时,肺炎链球菌荚膜多糖也是目前市售 23 价疫苗的主要成分,本研究的结果为提高荚膜生产量提供了一种新的思路,有潜在的实用价值。

参考文献

- [1] Agarwa V, Hammerschmidt S, Malm S, Berqmann S, Riesbeck K, Blom AM. Enolase of *Streptococcus pneumoniae* binds human complement inhibitor c4b-binding protein and contributes to complement evasion. *Journal of Immunology*, 2012, 189 (7) : 3575-3584.
- [2] Chen Y, Deng W, Wang SM, Mo QM, Jia H, Wang Q, Li SG, Li X, Yao BD, Liu CJ, Zhan YQ, Ji C, Lopez AL, Wang XY. Burden of pneumoniae and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in China among children under 5 years of age: a systemic literature review. *PLoS One*, 2011, 6: e27333.
- [3] 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 (6) : e1000476.
- [4] Mavroidi A, Aanensen DM, Godoy D, Skovsted IC, 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.
- [5] Shainheit MG, Mule M, Camilli A. The core promoter of the capsule operon of *Streptococcus pneumoniae* is necessary for colonization and invasive disease. *Infect and Immunity*, 2014, 82 (2) : 694-705.
- [6] Wu K, Yao R, Wang H, Pang D, Liu Y, Xu H, Zhang S, Zhang X, Yin Y. Mucosal and systemic immunization with a novel attenuated pneumococcal vaccine candidate confer serotype independent protection against *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Vaccine*, 2014, 32 (33) : 4179-4188.
- [7] Wu K, Huang J, Zhang Y, Xu W, Xu H, Wang L, Cao J, Zhang X, Yin Y. A Novel Protein, RafX, Is Important for Common Cell Wall Polysaccharide Biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*: Implications for Bacterial Virulence. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196 (18) : 3324-3334.
- [8] Claverys JP, Dintilhac A, Pestova EV, Martin B, Morrison DA. Construction and evaluation of new drug-resistance cassettes for gene disruption mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*, using an ami test platform. *Gene*, 1995, 164 (1) : 123-128.
- [9] Lacks S, Hotchkiss RD. A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1960, 39: 508-518.
- [10] Kaicheng Wang, Chengping Lu, Weixing Fan. Bacterial capsular polysaccharide. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (12) : 1578-1584. (in Chinese)
王楷成, 陆承平, 范伟兴. 细菌荚膜多糖. *微生物学报*, 2011, 51 (12) : 1578-1584.
- [11] Guidolin A, Morona JK, Morona R, Hansman D, Paton JC. Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F. *Infect and Immunity*, 1994, 62 (12) : 5384-5396.
- [12] Hathaway LJ, Brugger SD, Morand B, Bangert M, Rotzetter JU, Hauser C, Graber WA, Gore S, Kadioglu A, Mühlemann K. Capsule type of *Streptococcus pneumoniae* determines growth phenotype. *PLoS Pathogens*, 2012, 8 (3) : e1002574.
- [13] Ko KS, Park S, Oh WS, Suh JY, Oh T, Ahn S, Chun J, Song JH. Comparative analysis of growth-phase-dependent gene expression in virulent and avirulent *Streptococcus pneumoniae* using a high-density DNA microarray. *Molecules and Cells*, 2006, 21 (1) : 82-88.
- [14] Moscoso M, Garcia E. Transcriptional regulation of the

capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae*: a bioinformatic analysis. *DNA Research*, 2009, 16 (3) : 177-186.

Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 25097-25109.

[15] Kloosterman TG, Hendriksen WT, Bijlsma JJ, Bootsma HJ, van Hijum SA, Kok J, Hermans PW, Kuipers OP.

Identification of a point mutation in the promoter region of *cps* operon responsible for capsular polysaccharide deficiency in *Streptococcus pneumoniae* SPY1

Jianmin Wang¹, Xiuyu Xu², Feng Ma³, Hongmei Xu¹, Libin Wang¹, Yan Xing³, Yufeng Su¹, Xuemei Zhang^{1*}

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

²Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

³The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: [Objective] To determine if the point mutation of nt313713 T→C in the promoter region of capsular polysaccharide biosynthesis (*cps*) operon is responsible for the deficiency of capsular polysaccharide in *S. pneumoniae* SPY1 strain. [Methods] Western blot was used to compare the amounts of capsular polysaccharide between the wild-type strain and SPY1 strain. Real-time quantitative PCR was used to determine transcription levels of the first four genes of *cps* operon, *cps2A*, *cps2B*, *cps2C* and *cps2D*. The *lacZ* gene was used as a reporter gene to report the strength of the promoters on *cps* transcription. The *cps* promoter was amplified by PCR from the wild-type strain or SPY1 strain. The amplified fragments were cloned into shuttle vector pEVP3, transformed into *S. pneumoniae* D39 or SPY1 strain. The transcription activities of the promoters on capsular polysaccharide biosynthesis were determined by using β-galactosidase as the reporter. Transmission electron microscopy and the Neufeld test were used to reveal the changes in capsule. [Results] Compared to that in the wild-type strain, mRNA levels of the *cps* genes were significantly decreased in SPY1 strain. The amount of CPS was also decreased in SPY1 strain. β-galactosidase activities in SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1} and D39-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1} were decreased by about 79% and 76%, respectively, compared to that of the control. Transmission electron microscopy showed that the amount of the capsular polysaccharide of SPY1-pEVP3-*cps* promoter^{D39} strain was restored to the wild-type level. In addition, capsular polysaccharide was absent in the D39-pEVP3-*cps* promoter^{SPY1} (NC_008533.1 313713 T→C) strain as determined by Neufeld test. [Conclusion] The point mutation of nt313713 T→C in the *cps* promoter region results in a significantly reduced transcription of the *cps* genes, which is responsible for the significant reduction or even absence of the biosynthesis of capsular polysaccharide in SPY1 strain.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, capsule, point mutation

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Joint Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20135503110004)

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

Received: 13 October 2014/Revised: 5 January 2015