

## *clpE* 基因缺失对肺炎链球菌毒力的影响

张群, 尹楠林, 胥文春, 王虹, 庞丹, 杨晓亮, 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 *clpE* 基因缺失对肺炎链球菌毒力的影响。【方法】用长臂同源多聚酶链式反应(LFH-PCR)方法失活 *clpE* 基因, 用 PCR、测序鉴定缺失菌株, 通过动物实验观察 *clpE* 基因缺失株毒力改变情况, 同时用细胞实验比较 *clpE* 基因缺失株和野生菌对宿主细胞的粘附和侵袭能力, 最后用实时荧光定量 PCR 分析自溶素(major autolysin A, *lytA*)、表面黏附素 A(pneumococcal surface adhesion A, *psaA*)、溶血素(pneumolysin, *ply*)、肺炎链球菌表面蛋白 A(pneumococcal surface protein A, *pspA*) 和神经氨酸酶(neuraminidase, *nanA*) 的表达。【结果】小鼠毒力实验表明野生菌株半数致死时间 54 h, 而缺失株半数致死时间为 21 d, 两者比较有统计学差异( $P < 0.01$ )。缺失菌在对宿主细胞的粘附能力明显低于野生菌株( $P < 0.05$ )。实时荧光定量 PCR 显示 *clpE* 缺失株的五个毒力因子 mRNA 表达水平均低于野生菌, 两者比较有统计学差异( $P < 0.05$ )。【结论】ClpE 通过调控肺炎链球菌多种毒力因子表达, 而影响其毒力。

**关键词**: 肺炎链球菌; 毒力因子; 实时荧光定量 PCR; 细菌粘附; *clpE* 基因

中图分类号: R378 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)02-0233-06

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*)是一种常见的条件致病菌, 是引起肺炎、脑膜炎和中耳炎最常见的病原菌<sup>[1]</sup>。肺炎链球菌从定植到引起疾病, 它必须适应宿主体内各种变化的环境。ClpATP 酶在这一过程中扮演着重要角色, 它帮助细菌适应各种环境变化, 从而让细菌穿过宿主的防御系统。ClpE 是一种仅存在于革兰氏阳性菌中的 HSP-100/Clp ATP 酶<sup>[2]</sup>, 它与 ClpP 一起可形成 Clp 蛋白酶复合体, 可通过清除细胞异常或错误折叠的蛋白质以调控某些功能蛋白的稳定性和活性, 从而影响细菌的多种生物学性质。因此 ClpE 可能在肺炎链球菌的致病过程中发挥重要的作用。本研究拟首先通过 LFH-PCR (long flanking homology polymerase chain reaction) 方法失活肺炎链球菌的 *clpE* 基因, 获得肺炎链球菌的 *clpE* 缺失菌株; 再分别从整体水平、细

胞水平和分子水平比较该缺失株与野生菌的毒力表达差异, 分析 ClpE 影响肺炎链球菌毒力的机制, 为深入了解 Clp 蛋白酶在细菌致病过程中的作用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 材料来源**: 雌性 BALB/c 小鼠 24 只, 体重 18~22 g, 购自重庆医科大学实验动物中心。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)。肺 II 型上皮细胞(A549), 购自中国科学院上海细胞研究所细胞库。人脐静脉内皮细胞(HUECV)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(30600267)

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

作者简介: 张群(1981-), 女, 四川省人, 博士研究生, 主要从事肺炎链球菌致病机制方面的研究。E-mail: zhangqun198166@163.com

收稿日期: 2008-09-09; 修回日期: 2008-10-23

**1.1.2 主要试剂和仪器** :C + Y 半合成培养基 ;TSA 血平板 ;肺炎链球菌 CPM8 染色体 DNA(含有红霉素抗性基因 *erm*) 感受态刺激肽(CSP)由美国 Morrison DA 教授惠赠。胎牛血清(FCS)(Gibco);1640 培养基(Hyclone 公司);Trypsin(Difco 进口分装);RNA 提取

试剂(Omega 公司);DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒(上海华舜公司);实时荧光定量 PCR 试剂(TaKaRa 公司);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	Primers(5'→3')
P1	ACGATGACGAGCGACTTT
P2	AGCAGAATTAGCGAGAAA
P3	ATCAAACAATTTTGGGCCCGCTTGCCCTTTGTCCATTA
P4	ATTCTATGACTCGCTGCCGACTTTAGACATGCAGGGACAA
<i>erm</i>	forward : CCGGCCCAAAAATTTGTTTAT reverse : AGTCGGCAGCGACTCATAGAAT
<i>clpE</i>	forward : GCTTCGGTCTTTCTGTGA reverse : CTGATAGTATGATTGCGCTTT
<i>ply</i>	forward : GCACCACTATGATCCAGCAGTA reverse : CAGGCTTGCCGATTTCTATAC
<i>lytA</i>	forward : CAGGCACCATTATCAACAGGTC reverse : ACGCACACTCAACTGGGAATC
<i>psaA</i>	forward : CTAAAGCCTATGGTGTCCCAAG reverse : CGGTCATCCACATTGATTCTAC
<i>pspA</i>	forward : CTAGGAAAAGAGCAACAGGACTTG reverse : TCGCTAGTGCTACCTTTAGAGTTG
<i>nanA</i>	forward : AGTCTCTGAAGAAGGCTGGCTCT reverse : GAGCAGTGGTATTTGGAACGTC
16S rRNA	forward : GTAGTCCACGCTGTAACGATGAGT reverse : CTGTCCCGAAGGAAAACCTCTATCT

### 1.1 连接片段的制备

首先用 PCR 分别扩增出 D39 的上游片段 *clpE*-UP(P1、P3) 下游片段 *clpE*-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'、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 -70℃ 保存的 D39 菌株 200 μL 培养于 CTM 培养基(10 mL C + Y 中含 1 mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 和 2 g/L BSA)中,当细菌达到一定菌密度时( $OD_{540} = 0.08 \sim 0.1$ ) 加入 CSP,冰上放 30 min,加连接片段,37℃ 孵育 90 min,然后铺于含红霉素(0.25 mg/L)的 TSA 上,37℃ 孵育箱培养 24~48 h,挑取血平板上的转化菌落,于含红霉素(0.25 mg/L)的 C + Y 中增菌,保存并提取 DNA。

### 1.4 缺失菌株的鉴定

缺失菌株的 PCR、测序鉴定:分别以 D39、*clpE* 缺失菌株( $\Delta clpE$ )的染色体 DNA 为模板,用 *erm*、*clpE* 的引物扩增 *erm*(约 780 bp)基因和 *clpE*(303 bp)基因;用 P1、P2 扩增 UP-*erm*-DW(1552 bp)。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 缺失菌株的生长情况

分别挑取 D39、 $\Delta clpE$  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 D39 及  $\Delta clpE$  在 C + Y 培养基中培养至  $OD_{620} = 0.498$ (菌密度约  $1 \times 10^8$  CFU/mL)。24 只 BALB/c 小鼠采用随机数目表随机分为 2 组,每组 12 只,分别腹腔注射 100 μL D39 菌液和 100 μL  $\Delta clpE$  菌液,均含  $1 \times 10^2$  CFU/mL,记录小鼠死亡时间,计算半数致死时间。

### 1.7 肺炎链球菌粘附、侵袭实验

将细胞 A549、HUECV 分别接种于 24 孔培养板孔,接种密度为  $2 \times 10^4$ /孔,单层贴壁(约  $5 \times 10^6$ /孔)后,吸出孔内液体,用 PBS(7.2)洗涤 3 次,细菌 37 度培养致对数生长期中期  $10^8$  CFU/mL,用 1640 (10% FCS)稀释  $10^7$  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。移出培养基,用 PBS 洗涤 3 次,加入 1 mL 含有 1% FCS、安卞青霉素(10 μg/mL)和庆大霉素(200 μg/mL)的 1640 到 24 孔板中同细胞孵育 1 h,杀死细胞外的细菌。用 PBS 洗涤 3 次后,用 100 μL of 0.25% trypsin-0.02% EDTA 消化细胞,然后用 400 μL of 0.025% Triton X-100 裂

解细胞。将裂解液适当的稀释,接种到血平板,计数菌落,以得到细胞内的细菌数(即细菌的侵袭数),试验重复3次。按以上步骤操作,不加抗生素进行处理,可获取粘附和细胞内细菌的总数,将粘附和细胞内细菌总数减去细菌侵袭数,获得细菌的粘附数。

### 1.8 实时荧光定量 PCR 测定毒力因子的 mRNA 表达水平

**1.8.1 荧光定量 PCR 标准品的制备:**在普通 PCR 仪上分别对 16S rRNA 和毒力基因进行扩增,胶回收 PCR 产物,并与 PMD18-T 载体连接,产生 PMD18-T 载体 + 毒力基因片断的质粒;将质粒转入感受态细菌,进行蓝白斑筛选;抽提纯化质粒,做酶切、PCR、测序鉴定。用紫外分光光度计  $OD_{260}$  检测质粒浓度并计算及换算拷贝数。梯度稀释质粒,得到几个毒力基因的标准品。

**1.8.2 实时荧光定量 PCR:**将野生株和缺失株在 C + Y 培养基中增菌至相同菌密度,提取细菌总 RNA,并逆转录成 cDNA。然后以 cDNA 为模板,分别扩增 16S rRNA 和毒力基因,扩增反应条件:95℃ 10 s, 95℃ 15 s, 60℃ 30 s 收集荧光信号,72℃ 30 s,共 40 循环。每 1 个样本做 3 个平行管。每次扩增需同时做 16S rRNA 和目的基因的标准曲线,根据标准曲线可获得毒力因子 mRNA 的相对水平。

### 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 Long-rank 检验,以 SAS 统计软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 肺炎链球菌 *clpE* 基因缺失菌株的获取

分别以 D39、CMP8 的 DNA 为模板,用 PCR 扩增出了 *clpE*-DW (416 bp)、*clpE*-UP (356 bp) 和 *erm* (780 bp) 3 个片段。LFH-PCR 连接 3 个片段:UP-*erm*-DW (1552 bp),测序结果显示 3 个片段连接正确。利用同源重组,将连接片断转化入 D39 野生菌株,红霉素血平板筛选出 *clpE* 缺失菌株。

### 2.2 $\Delta clpE$ 缺失菌株的 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 *clpE* 基因,因此缺失菌株在 780 bp 处可见目的片段,303 bp 处无目的片段,而野生菌株在 780 bp 处无目的片段,303 bp 处有目的片段;P1、P2 扩增缺失菌株,在约 1552 bp 处可见目的片断(图 1-A、B)。测序列结果证明 3 个片段连接正确,*clpE* 基因已被 *erm* 基因所替代。

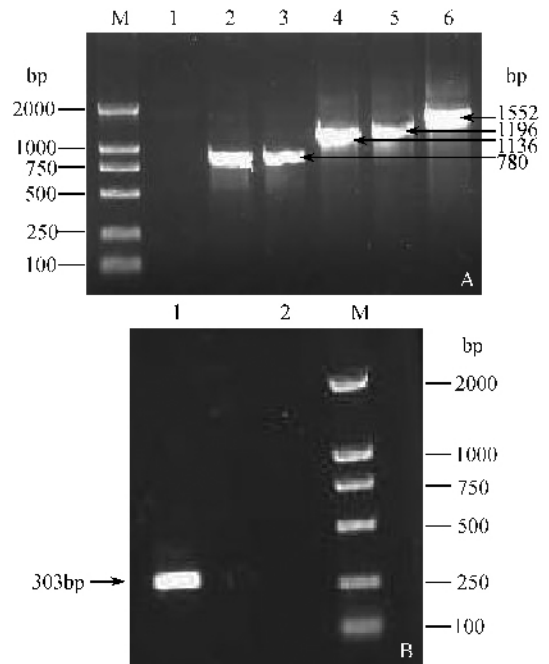


图 1 *clpE* 缺失菌株的 PCR 鉴定结果

Fig. 1 PCR analysis of *S. pn* transformed with LFH-PCR product.

A: Lanes M, molecular size marker; Lane 1, *erm* of D39 (negative control); Lane 2, *erm* of CPM8 (positive control); Lane 3, *erm* of  $\Delta clpE$ ; Lane 4, *clpE*-DW + *erm* of  $\Delta clpE$ ; Lane 5, *clpE*-UP + *erm* of  $\Delta clpE$ ; Lane 6, UP-*erm*-DW fragment amplified with P1 and P2 in the  $\Delta clpE$ ; B: Lanes 1, *clpE* of D39; Lane 2, *clpE* of  $\Delta clpE$ ; M, molecular size marker.

### 2.3 D39 和 $\Delta clpE$ 的生长曲线

从生长曲线可以看出在液体培养基中缺失菌株较野生株生长缓慢趋势,表明 *clpE* 基因缺失后影响细菌的生长(图 2)。

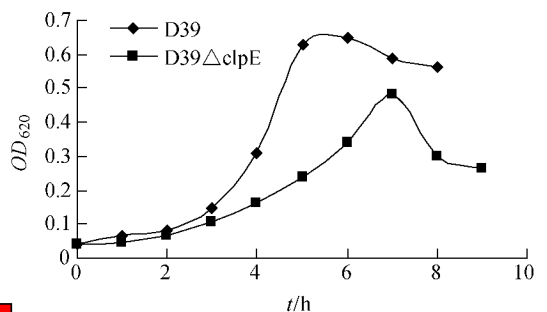


图 2 *S. pn* 在 C + Y 培养基中生长曲线

Fig. 2 The growth curve of *S. pn* D39 and *clpE*-deletion strain in C + Y media.

### 2.4 小鼠毒力实验

同野生菌相比较,缺失菌株在小鼠体内的生存时间大大延长,野生菌株半数致死时间 < 3 d,而缺失菌株  $\geq 21$  d。两者毒力具有统计学差异(Long-rank 分析:  $X^2 = 31.26$ ,  $P < 0.01$ ) (图 3)。实验结果

表明 *clpE* 缺失可显著降低肺炎链球菌的毒力。

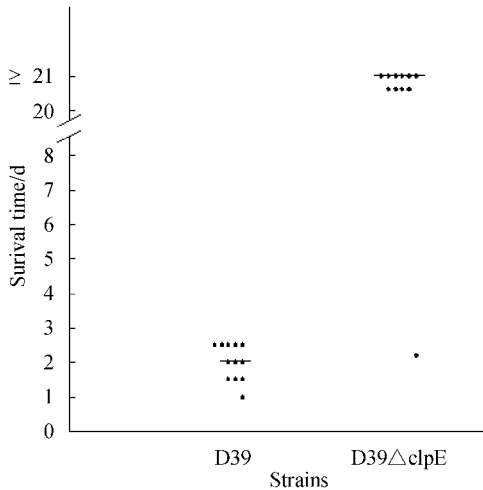


Fig.3 小鼠腹腔注射肺炎链球菌后毒力实验结果

Fig.3 Survival times of mice after intraperitoneal challenge.

## 2.5 肺炎链球菌细胞粘附、侵袭实验

为了比较野生菌和  $\Delta clpE$  对宿主细胞的粘附、侵袭能力的差异,我们分别检测了野生菌和  $\Delta clpE$  对 A549 和 HUECV 的粘附、侵袭能力。实验结果表明  $\Delta clpE$  对这两种宿主细胞的粘附和侵袭能力均显著降低 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。结果提示 ClpE 可影响肺炎链球菌对宿主细胞的粘附、侵袭。

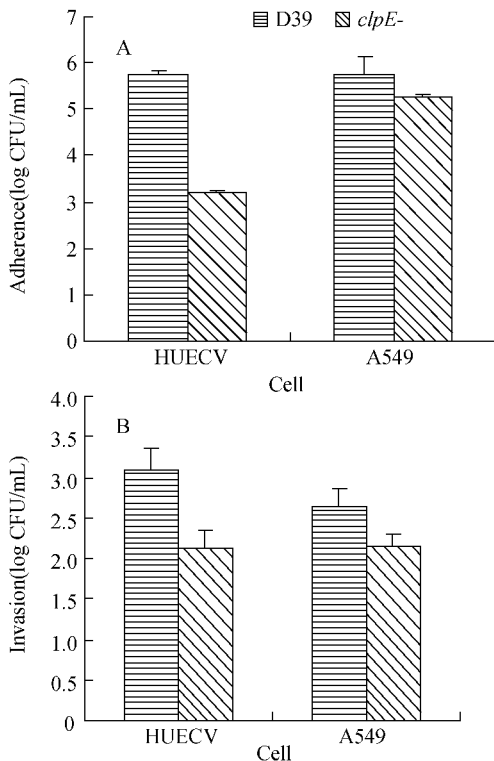


Fig.4 肺炎链球菌对宿主细胞的粘附 (A) 侵袭 (B) 实验

Fig.4 Adherence (A) to and invasion (B) of host cells by *S. pneumoniae* D39 and its isogenic *clpE* deletion in vitro.

## 2.6 实时荧光定量 PCR

分别测定 D39 和  $\Delta clpE$  几个毒力因子的 mRNA 水平,结果见图 5。实时荧光定量 PCR 结果显示毒力基因 *ply*、*psaA*、*nanA*、*lytA* 和 *pspA* 在野生菌株和缺失菌株中都有一定的表达,但在  $\Delta clpE$  中的表达量较在野生株中明显下降 ( $P < 0.05$ )。实验结果表明 ClpE 参与了调控毒力因子的表达。

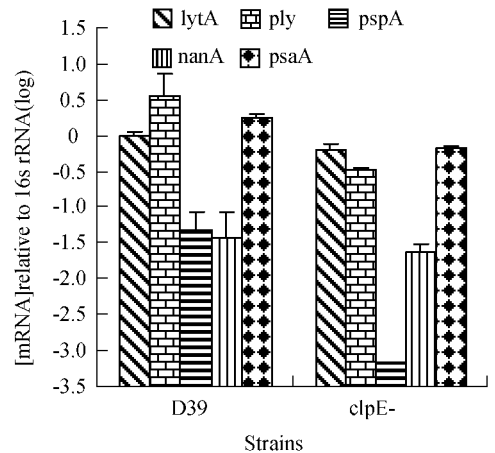


Fig.5 毒力基因表达量与相应 16S rRNA 表达量的比值

Fig.5 Relative mRNA concentrations of virulence gene in D39 and its isogenic *clpE* deletion were determined by real-time RT-PCR.

## 3 讨论

1987 年通过双向凝胶电泳首次发现了 ClpE,后经确定它属于 HSP100ATP 超家族,是 CtsR 调节子的一部分<sup>[3-4]</sup>。在对单核细胞增多性李司氏菌的研究中发现,ClpE 在细菌毒力、高温下生长、细胞分化等方面扮演着重要角色<sup>[5]</sup>。以前的研究仅发现,ClpE 是肺炎链球菌主要的耐热性 ClpATP 酶,它同肺炎链球菌毒力的关系并不清楚<sup>[6]</sup>。本研究就 ClpE 对肺炎链球菌毒力的影响及其机制做了初步研究。

本研究结果显示 *clpE* 缺失菌株的生长繁殖能力大大下降,小鼠毒力试验结果显示 *clpE* 基因缺失菌株感染小鼠的生存时间较野生菌株显著延长,可见 *clpE* 基因缺失可显著减弱肺炎链球菌的毒力。

为进一步理解 *clpE* 缺失导致肺炎链球菌毒力下降的原因,我们分别从细胞水平和分子水平探索 *clpE* 影响肺炎链球菌毒力的机制。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。我们的研究结果显示 *clpE* 缺失菌在 A549 和 HUCV 中的粘附、侵袭能力都显著下降。其原因可能是 ClpE 影响了细菌表面与粘附和侵袭相关蛋白的表达,从而导

致 *clpE* 缺失菌对宿主细胞的粘附的下降。

从毒力基因的 mRNA 表达来看, *clpE* 缺失后 *ply*、*psaA*、*lytA*、*nanA* 和 *pspA* 5 种毒力因子的表达均下降。Ply 是肺炎链球菌的一个重要的毒力因子, 属于巯基激活毒素家族, 可引起广泛的毒性效应<sup>[7]</sup>。研究显示 Ply 是小鼠败血症或菌血症死亡的重要原因<sup>[7, 40]</sup>。PspA 存在与肺炎链球菌的细胞壁上, 也是一个重要的毒力因子。它在逃避补体介导的吞噬作用中发挥着重要作用, 同时还可结合乳铁蛋白, 防止细菌被杀<sup>[11-14]</sup>。本实验结果显示 *clpE* 缺失菌 *ply* 和 *pspA* 的表达比野生菌分别降低了 10.7 倍、50.7 倍, 这可能是导致感染了 *clpE* 缺失菌小鼠存活时间延长的重要原因。我们研究还显示几种与粘附相关的毒力因子在 *clpE* 缺失菌中的表达也降低, 如 NanA、PspA、PsaA。NanA 可分解细胞表面或体液中的多糖、糖蛋白、低聚糖上的唾液酸残基, 暴露宿主细胞表面的 S. pn 粘附受体, 从而促进细菌的粘附<sup>[15]</sup>。PsaA 也是肺炎链球菌的一种黏附分子, 其与血链球菌的黏附素 SsaB 和副血链球菌黏附素 FimA 的 DNA 序列有高度的同源性<sup>[16-17]</sup>。因此 *clpE* 缺失菌对宿主细胞的粘附、侵袭能力显著下降与这些毒力因子表达下降密切相关。

总之, ClpE 可调控了毒力基因的表达, 导致细菌毒力的改变。ATP 依赖的蛋白酶 Clp 系统是一个复杂的调控网络, 本研究对 ClpE 影响细菌毒力的作用机制做了初步分析, 这为我们进一步理解 ATP 依赖的蛋白酶 Clp 系统的作用及其机制奠定基础; 同时也为我们预防和治疗肺炎链球菌提供了新的思路。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Marc PG, Thomas C, Yuri P, et al. A review of vaccine research and development: Human acute respiratory infections. *Vaccine* 2005 23(50): 23 5708 - 5724.
- [ 2 ] Ingmer H, Vogensen FK, Hammer K, et al. Disruption and analysis of the *clpB*, *clpC*, and *clpE* genes in *Lactococcus lactis*: ClpE, a new Clp family in gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* 1999, 181(7): 2075 - 2083.
- [ 3 ] Hecker M, Richter A, Schroeter A, et al. Synthesis of heat shock proteins following amino acid or oxygen limitation in *Bacillus subtilis* *relA*<sup>+</sup> and *relA*<sup>-</sup> strains [ C ]. *Zeitschrift für Naturforschung* 1987 42(7-8): 941 - 947.
- [ 4 ] Miethke M, Hecker M, Gerth U. Involvement of *Bacillus subtilis* ClpE in CtsR degradation and protein quality control. *Journal Bacteriology* 2006, 188(13): 4610 - 4619.
- [ 5 ] Nair S, Frehel C, Nguyen L, et al. ClpE, a novel member of the HSP100 family is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* 1999 31(1): 185 - 196.
- [ 6 ] Chastanet A, Prudhomme M, Claverys JP, et al. Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival. *Journal of Bacteriology* 2001, 183(24): 7295 - 7307.
- [ 7 ] Novak R, Tvomanen E. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Seminars in Respiratory Infections* 1999, 14(3): 209 - 217.
- [ 8 ] Benton KA, Everson MP, Briles DE. A pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae* causes chronic bacteremia rather than acute sepsis in mice. *Infection and Immunity* 1995 63(2): 448 - 455.
- [ 9 ] Musher DM, Phan HM, Baughn RE. Protection against bacteremic pneumococcal infection by antibody to pneumolysin. *The Journal Infections Disease* 2001, 183(5): 827 - 830.
- [ 10 ] Ogunniyi AD, LeMessurier KS, Graham RM, et al. Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), and PspC to pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a mouse model. *Infection and Immunity* 2007, 75(4): 1843 - 1851.
- [ 11 ] Abeyta M, Hardy GG, Yother J. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity* 2003, 71(1): 218 - 225.
- [ 12 ] Håkansson A, Roche H, Mirza S, et al. Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A. *Infection and Immunity* 2001, 69(5): 3372 - 3381.
- [ 13 ] Hammerschmidt S, Bethe G, Remane PH, et al. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity* 1999 67(4): 1683 - 1687.
- [ 14 ] Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, et al. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity* 1999, 67(9): 4720 - 4724.
- [ 15 ] Yesilkaya H, Manco S, Kadioglu A, et al. The ability to utilize mucin affects the regulation of virulence gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* 2008 278(2): 231 - 235.
- [ 16 ] Berry AM, Paton JC. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesion essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity* 1996,

[ 17 ] Anderton JM , Rajam G , Romero-Steiner S , et al. E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface

adhesin A ( PsaA ) of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis* 2007 42 ( 5 - 6 ) 225 - 236.

## Effect of *clpE* gene deletion on virulence of *Streptococcus pneumoniae*

Qun Zhang , Nanlin Yin , Wenchun Xu , Hong Wang , Dan Pang , Xiaoliang Yang , Yibing Yin , Xuemei Zhang\*  
( Key Laboratory of Medical Diagnostics , Ministry of Education , Chongqing Medical University , Chongqing 400016 , China )

**Abstract :** [ **Objective** ] To study the effect of *clpE* gene deletion on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. [ **Methods** ] The *clpE*-deficient strain was constructed by LFH-PCR and identified by PCR and sequencing. The impact of *clpE* mutant on the virulence of *S. pneumoniae* was evaluated in a mouse model. In addition , we also studied the effect of *clpE* mutant on adherence and invasion of host cells. Real time RT-PCR was used to measure the mRNA expression levels of autolysin A , pneumococcal surface adhesion A , pneumolysin , pneumococcal surface protein A and neuraminidase. [ **Results** ] The *clpE* gene was replaced completely by erm cassette. Mice virulence experiments showed that the median lethal time of the wide-type was 54 h , whereas that of *clpE* mutant was 21d (  $P < 0.01$  ). Cell culture infection experiments indicated that adherence and invasion of *clpE* mutant were strongly reduced (  $P < 0.05$  ). The expression of virulent factors in *clpE* mutant was lower than that of the wild-type (  $P < 0.05$  ). [ **Conclusion** ] ClpE is involved in virulence by modulating the expressions of virulence factors.

**Keywords :** streptococcus pneumoniae ; virulence factor ; real time RT-PCR ; bacterial adhesion ; *clpE* gene

( 本文责编 : 张晓丽 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China ( 30600267 )

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

Received : 9 September 2008 / Revised : 23 October 2008

### 《微生物学报》答作者问——关于审稿 2

问 : 贵刊的审稿程序是怎样的 ? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用 ?

答 : 我们的承诺是争取在 2 个月之内给予答复 , 5 ~ 7 个月之内刊出。

- ( 1 ) 收到来稿后 , 首先将请 2 位专家进行初审 , 再送主编进行最后的总审 , 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审的 2 位专家的意见分歧较大 , 编辑部将再请第 3 位专家进行初审 , 之后再送主编总审 , 那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。
- ( 2 ) 完成审稿后 ( 即主编给出总审意见 ) , 编辑会给作者发出 e-mail 告知修改意见 ( 包括学术上的和写作格式上的 ) , 作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。

问 : 如我的投稿没有被贵刊录用 , 是否告知退稿原因 ? 对退稿有异议怎么办 ?

答 : 本着对每一篇投稿负责的原则 , 本刊一贯遵循三审制的制度 , 即 : 编辑部内审、专家初审、主编总审。所以无论录用和退稿 , 都会给作者一份比较全面的审稿意见。

- ( 1 ) 对于每一篇退稿 , 我们都会详细写明退稿原因 , 为您进一步修改论文提供帮助。
- ( 2 ) 如您对退稿意见有异议 , 可以给我们写信表明看法 , 我刊将请专家予以复审。

问 : 我可否指定审稿人 , 或言明请某审稿人回避 ?

答 : 您在投稿时可以附上您推荐的审稿人名单 , 或请予回避的审稿人名单 , 供编辑部参考 , 但编辑部是否采纳将视具体情况而定。