

一种溶菌酶样蛋白对肺炎链球菌毒力及荚膜多糖合成的影响

黄健¹, 姜学美², 黄美容¹, 杨晓亮¹, 刘明伟¹, 王虹¹, 孟江萍^{1*}

¹重庆医科大学医学检验系, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016

²重庆市药品检验所, 重庆 400015

摘要:【目的】为了研究肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*) 的一种假想的溶菌酶样蛋白在细菌生物学性状及其致病中的作用。【方法】利用长臂同源 PCR 对该基因进行敲出, 并同时构建带有拯救质粒的缺失菌株, 观察 D39 野生菌、缺失菌与带有拯救质粒的缺失菌株在相关生物学性状及其致病力改变, 从而鉴定这种假想溶菌酶样蛋白的功能。【结果】缺失菌与野生菌相比, 细菌生长减缓, 毒力下降, 荚膜多糖合成明显减少。而将拯救质粒转入缺失菌株后, 该溶菌酶样蛋白的 mRNA 表达水平较野生菌高, 其毒力及荚膜合成较缺失菌显著增高, 但未达到野生菌水平。【结论】这种溶菌酶样蛋白是肺炎链球菌的一种新毒力因子, 可能通过参与调控肺炎链球菌增殖及荚膜多糖的表达而影响毒力。

关键词: 肺炎链球菌, 溶菌酶, 毒力, 回复突变, 荚膜

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 01-0059-07

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*) 是一种常见的革兰阳性条件致病菌, 可引起肺炎、中耳炎、菌血症、脑膜炎等严重疾病, 在全球有较高的发病率和死亡率^[1]。目前, 对肺炎链球菌的治疗主要使用抗生素治疗, 但近年来, 随着细菌耐药率的增高, 对肺炎链球菌感染的防治带来了新的挑战。在对肺炎链球菌致病机制的研究中发现, 一类在细菌感染宿主时, 细菌体内表达增高的基因即体内诱导基因, 与细菌在宿主体内的生存、致病密切相关, 被认为是细菌的毒力基因, 是筛选抗菌药物及疫苗的候选靶点来源^[2], 因此对于体内诱导基因的功能研究有助于新抗菌药物及疫苗的研发。

本课题组前期利用体内表达技术 (*in vivo* expression technology, IVET), 在体内筛选鉴定出肺炎链球菌的 15 个体内诱导基因^[3], 基因 *spn026* 为

其中一个功能未知基因, 其在 2 型菌株 D39 中对等的基因为 *spd0873*, 其编码蛋白属于溶菌酶家族成员, 但尚无文献验证其溶菌酶活性。生物信息学分析显示该假想蛋白拥有自溶酶 C 样结构域, 可能有溶菌酶活性, 因此我们将其命名为溶菌酶样蛋白, 并对其生物学功能及对细菌毒力的影响进行了研究。

本研究通过替代失活的方式构建该基因的缺失菌株, 比较其与野生菌株的增值能力、细菌形态、荚膜合成及感染小鼠的能力等方面的变化, 鉴定该基因的功能。并通过构建带有拯救质粒的基因缺失菌株, 排除由于基因敲出后可能会通过染色体邻近效应或极性效应对周边基因表达的影响, 从而确证其功能^[4], 为以该蛋白为靶点进行抗菌药物或疫苗研究提供可靠的实验依据。

基金项目: 国家自然科学基金 (30700914)

* 通信作者。Tel: +86-23-89012397; E-mail: mjilily2000@163.com

作者简介: 黄健 (1983 -), 男, 硕士研究生, 从事肺炎链球菌毒力因子致病机理的研究。E-mail: zmchj2001@163.com

收稿日期: 2010-07-13; **修回日期:** 2010-09-19

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体:肺炎链球菌 D39 菌株购自英国国家典型菌种保藏中心(National Collection of Type Culture, NCTC),肺炎链球菌 CPM8 菌株(含有红霉素抗性基因)由美国加州大学 Morrison 教授惠赠,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株(本室保存),PMV158 穿梭质粒由 Manuel Espinosa 教授(Biological Research Center Ramiro de Maeztu, Spain)惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器:Primer star 高保真酶, *Bgl* II, *sal* I 限制性内切酶, DNA maker, Real Time PCR 试剂盒, DNA 纯化试剂盒, RNA 逆转录试剂盒, 购自 TaKaRa 公司; RNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司; T4 连接酶购自 Promega 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 胶回收试剂盒购自 Invitrogen 公司; 抗荚膜多糖抗体购自 Statens Serum Institut(丹麦), 其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 引物:引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成(表 1)。

表 1 用于扩增相关基因的引物

Table 1 Primer pairs used to amplify related genes

Primer	Sequence (5'→3')	Gene ID or reference
P1	ATCAATCTTGTCTCGGTCAG	GeneID:4442007
P2	CTCCTGCTATGACCTATGTG	GeneID:4442846
P3	ATCAAACAAATTTTGGGCCCGG - TAGCAGCAATCTTAGGAATCTA	GeneID:4442007
P4	AATTCTATGAGTCGCTGCCGACT - ATGTAAGAGTCCGGAATGAT	GeneID:4442846
DAM212	CCGGGCCAAAATTTGTTTGAT	See reference 5
DAM213	AGTCGGCAGCGACTCATAGAAT	See reference 5
0873F1	ACCGCTCGACATGAGAAAACAAATTCATCC	GeneID:4441962
0873R1	GCAGATCTTTAAGGTTTTAAAAAAAGT	GeneID:4441962
0873F2	CATAAGCGTAGACAGCAACT	GeneID:4441962
0873R2	GACAAACCGATTATTGACCT	GeneID:4441962
16s rRNA F	GTAGTCCACGCTGTAAACGATAAGT	GeneID:4441719
16s rRNA R	CTGTCCCGAAGGAAAACCTCTATCT	GeneID:4441719

Bolded section of P3 refers to a sequence complementary to DAM212. Bolded section of P4 refers to a terminus complementary to DAM213. The underline in 0873F1 and 0873R1 refers to sites *sal* I and *Bgl* II, respectively.

1.2 Spd0873 基因缺失菌构建

利用长臂同源 PCR 技术构建 spd0873 基因缺失菌,首先以肺炎链球菌 D39 菌株基因组 DNA 为模板,用 P1、P3 引物扩出 0873 上游基因, P2、P4 引物扩 0873 下游基因,然后以肺炎链球菌 CMP8 菌基因组为模板,用 DAM212、DAM213 引物扩红霉素基因(erm),然后将这三部分基因按等摩尔比例混合,用 P1、P4 引物,扩增出 spd0873up-erm-spd0873down 连接产物。将连接产物转化到肺炎链球菌 D39 菌,铺于含 0.25 μ g/mL 红霉素血平板上,挑出阳性转化子,经 PCR 及测序鉴定,正确即为 D39 Δ 0873 缺失菌(D39 Δ 0873)。

1.3 带有拯救质粒的缺失菌株构建

以肺炎链球菌 D39 菌株基因组 DNA 为模板,

用引物 0873F1、0873R1 PCR 扩增目的基因,经 *Sal* I + *Bgl* II 双酶切后插入具有相同酶切接头的 PMV158 穿梭质粒中,重组质粒命名为 PMV158 + 0873,然后转入 DH5 α 菌中,用含 16 μ g/mL 四环素的 LB 平板对阳性克隆进行筛选,对筛选出的阳性克隆进行菌液 PCR,双酶切及测序鉴定。将连接正确的 PMV158 + 0873 质粒转化到 D39 Δ 0873 缺失菌中,铺于 1 μ g/mL 四环素的血平板上,挑出阳性转化子,经 PCR 及测序鉴定正确后,即为带有拯救质粒的缺失菌株(D39 Δ 0873 + 0873)。

1.4 生长曲线及光镜形态检测

在含 2% 麦芽糖的 C + Y 培养基分别培养 D39、D39 Δ 0873 及 D39 Δ 0873 + 0873 菌,调节起始 OD 值一致,每隔 1h 测量一次吸光度值 OD₆₂₀,以吸光度

值为纵坐标,时间为横坐标绘制生长曲线,并涂片做革兰染色,于油镜下观察细菌形态变化。

1.5 小鼠毒力实验

将肺炎链球菌 D39、D39 Δ 0873 及 D39 Δ 0873 + 0873 菌株在 C + Y 培养基中培养至 $OD_{620} = 0.5$, 收集细菌,调节菌密度一致。将 BALB/c 小鼠随机分成 3 组,即 D39 组、D39 Δ 0873 组及 D39 Δ 0873 + 0873 组,每组 12 只,分别在腹腔内注入 0.1 mL 菌液即含有 1×10^8 CFU/mL,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。

1.6 荧光定量 PCR 检测 0873 基因表达

在含 2% 麦芽糖的 C + Y 培养基分别培养肺炎链球菌 D39、D39 Δ 0873 及 D39 Δ 0873 + 0873 菌株至 $OD_{550} = 0.6$,按 OMEGA 公司 RNA 提取试剂盒操作提取 RNA,然后逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,16S rRNA 为内参,以引物 0873F2、0873R2 进行荧光定量 PCR 检测,对 0873 基因进行相对定量检测,观察 spd0873 基因在 D39、D39 Δ 0873 及 D39 Δ 0873 回复突变菌中的表达量,以各菌株的 spd0873 mRNA 拷贝值与相应 16SRNA 拷贝值的比值取对数,用 GraphPad Prism 5 软件作图,用非配对 T 检验对实验结果进行统计学分析。

1.7 电镜检测

收集 10 mL 对数生长中期肺炎链球菌,以转速 $2400 \times g$ 离心 10 min,弃去上清,加入 1 mL 戊二醛固定,送电镜室制片,用透射电子显微镜 Hitachi-7500(日立公司)观察荚膜多糖改变,放大倍数 10 万倍。

1.8 ELISA 检测荚膜多糖含量

培养肺炎链球菌 D39、D39 Δ 0873 及 D39 Δ 0873 + 0873 菌株,10000 $\times g$ 收集细菌,用 PBS 洗涤细菌 3 次,用抗原包被液调节 $OD_{620} = 0.1$,加入 100 μ L 稀释后的细菌至酶标板中 4 $^{\circ}$ C 包被过夜,每个样本做 3 个平行孔,并设置空白对照。次日洗板封闭,封闭完成后洗板 6 次,按 1:1000 比例稀释抗荚膜多糖抗体,每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 1h,然后洗板 6 次,按 1:5000 稀释山羊抗兔 IgG,每孔加入二抗 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 45min,洗板后加入 TMB 显示液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 15min,加入终止液终止显色,波长 450nm 测 OD 值,用 GraphPad Prism 5 软件作图,用非配对 T 检验对实验结果进行统计学分析。

2 结果

2.1 肺炎链球菌 D39 Δ 0873 菌及 D39 Δ 0873 + 0873 菌株的构建及鉴定

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 spd - 0873 基因,因此在 PCR 鉴定中,缺失菌株可以 780 bp 的红霉素基因,而不能扩出 0873 基因;而野生菌株不含有红霉素基因,因此不能扩出红霉素基因,但能扩出 0873 基因。以缺失菌株基因组为模板,用 P1、P2 引物可以扩增出约 1386 bp 大小 0873 上游基因 - 红霉素基因 - 0873 下游基因连接产物,以上产物经测序鉴定正确,说明缺失菌株构建成功。

重组的 PMV158 + 0873 回复突变载体,转化入 DH5 α 菌中,经菌液 PCR、双酶切鉴定,均能获得 801bp 大小的目的基因片段,DNA 测序结果显示重组质粒读码框正确,碱基无突变。鉴定正确的重组载体转化肺炎链球菌 D39 spd0873 缺失菌株,在含有 1 μ g/mL 四环素的血平板上筛选出 6 个阳性克隆,经菌液 PCR 鉴定,能够扩增出 801bp 大小的目的基因,说明回复突变菌构建成功。

2.2 荧光定量 PCR 检测 spd0873 基因 mRNA

以 16S rRNA 为内参,运用荧光定量 PCR 检测 spd0873 在 D39、D39 Δ 0873 和 D39 Δ 0873 + 0873 菌

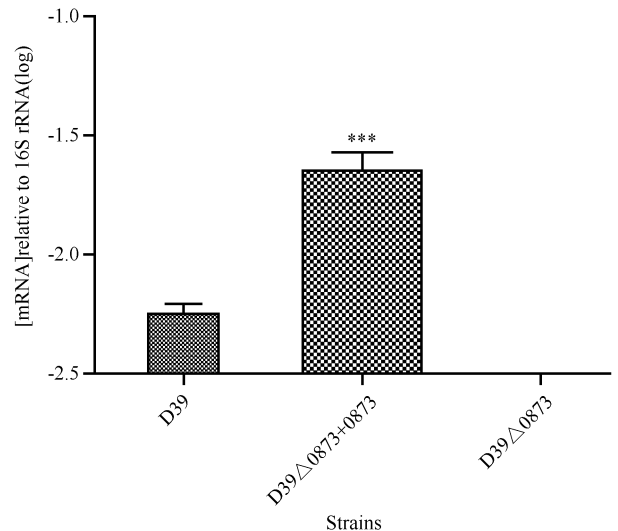


图1 SPD0873 基因在 D39、D39 Δ 0873 + 0873 和 D39 Δ 0873 菌中 mRNA 表达水平比较

Fig.1 mRNA expression level of spd0873 in *S. pn* D39, D39 Δ 0873 gene knockout mutant containing rescue plasmid and D39 Δ 0873 gene knockout mutant. (***, $P < 0.001$).

中的表达水平。结果显示缺失菌中不能检测到 0873 基因表达,提示 D39 Δ 0873 基因缺失菌构建成功;D39 Δ 0873 + 0873 菌株中 spd0873 基因有表达,甚至表达水平高于 D39 野生菌 ($P < 0.001$),提示带有拯救质粒的缺失菌株构建成功(图 1)。

2.3 D39、D39 Δ 0873 及 D39 Δ 0873 + 0873 回复突变菌的生长曲线

从生长曲线可以看出,在含 2% 麦芽糖的 C + Y 培养基中,D39 Δ 0873 菌较野生菌体外生长趋势变缓,而 D39 Δ 0873 + 0873 菌生长能力得以回复,但未能完全达到野生菌株的生长水平,表面 spd0873 基因缺失后影响细菌生长(图 2)。

2.4 D39、D39 Δ 0873 及 D39 Δ 0873 + 0873 菌光镜形态检查

在普通光学显微镜下,D39 野生菌在 C + Y 培养基中生长时,细菌成长链状排列,当对 spd0873 基因进行敲除后,细菌基本上不能成链,而 D39 Δ 0873

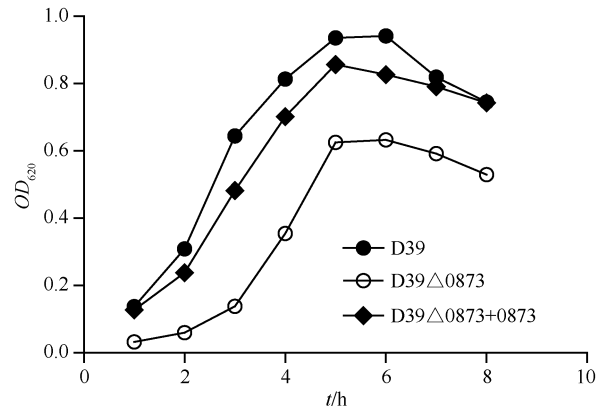


图 2 D39、D39 Δ 0873 和 D39 Δ 0873 + 0873 菌在含 2% 麦芽糖的 C + Y 培养基中的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of *S. pn* D39, D39 Δ 0873 gene knockout mutant and D39 Δ 0873 gene knockout mutant containing rescue plasmid in C + Y media plus 2% maltose.

+ 0873 菌较缺失菌株成链能力明显增强,接近于野生菌株的水平,表明 spd0873 基因能够影响到细菌成链性状(图 3)。

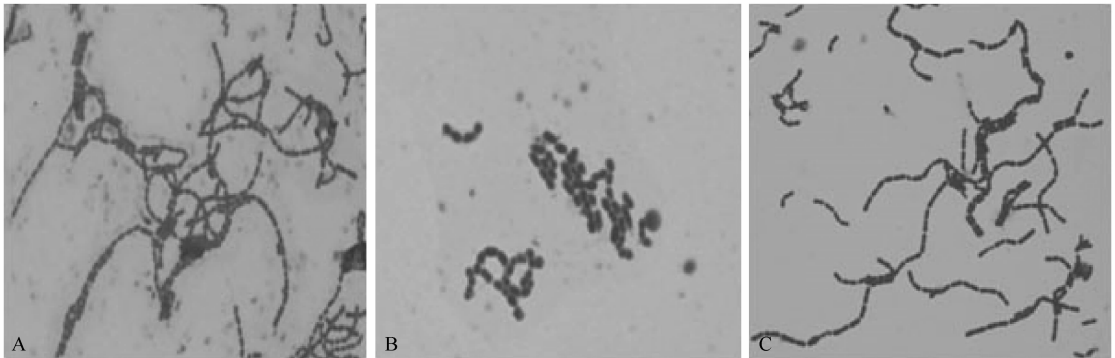


图 3 D39、D39 Δ 0873 及 D39 Δ 0873 + 0873 菌光镜形态 (1000 \times)

Fig. 3 Microscopic morphology of *S. pn* D39, D39 Δ 0873 gene knockout mutant and D39 Δ 0873 gene knockout mutant containing rescue plasmid (1000 \times). A. D39 strain; B. D39 Δ 0873 gene knockout mutant; C. D39 Δ 0873 gene knockout mutant containing rescue plasmid.

2.4 小鼠毒力实验

通过小鼠毒力实验研究显示,D39 野生菌毒力强,小鼠中位生存时间 < 12 h,与以前研究结果相符,而用相同菌量 D39 Δ 0873 菌攻毒时,小鼠生存时间显著延长,除了有 3 只在 75 h 左右死亡,其余小鼠一直存活。当在 D39 Δ 0873 菌中表达 spd 0873 基因后,可发现菌株毒力明显增强,中位生存时间约为 55 h ($P < 0.05$),表明 spd0873 是肺炎链球菌 D39 菌株中的一种毒力因子(图 4)。

2.4 电镜检查荚膜形成

通过在电镜下对 D39、D39 Δ 0873 和 D39

Δ 0873 + 0873 菌形态进行观察,可以看到 D39 野生菌株荚膜较厚,而缺失菌完全不能形成荚膜,当在缺失菌株中表达 spd0873 基因后,D39 Δ 0873 + 0873 菌中荚膜多糖的合成量虽未完全回复到野生菌株的水平,但较缺失菌荚膜多糖合成明显增加(图 5)。

2.5 荚膜多糖含量检测

用 ELISA 法对肺炎链球菌 D39 菌、D39 Δ 0873 及 D39 Δ 0873 + 0873 菌荚膜多糖含量进行检测,结果发现 spd 0873 缺失菌荚膜多糖表达量较野生菌明显减少,而 D39 Δ 0873 + 0873 菌荚膜多糖表达量明显高于缺失菌,但未完全回复至野生菌株水平 (P

< 0.001), 表明 *spd0873* 基因能够影响荚膜多糖合成 (图 6)。

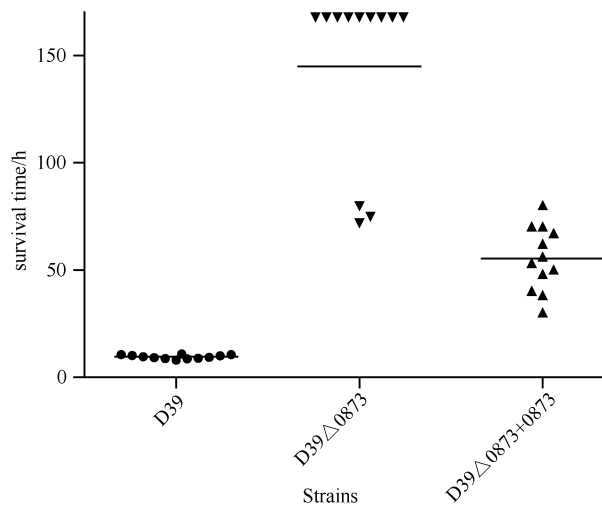


图 4 BALB/c 小鼠腹腔感染毒力实验

Fig. 4 virulence experiment for BALB/c mice after intraperitoneal infection.

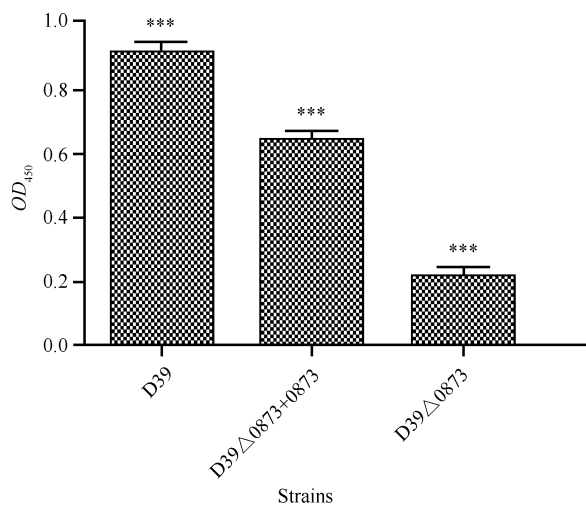


图 6 D39、D39 Δ 0873 + 0873 和 D39 Δ 0873 菌荚膜多糖含量比较

Fig. 6 Compare capsular polysaccharide content of *S. pn* D39, D39 Δ 0873 gene knockout mutant containing rescue plasmid and D39 Δ 0873 gene knockout mutant. (***, $P < 0.001$).

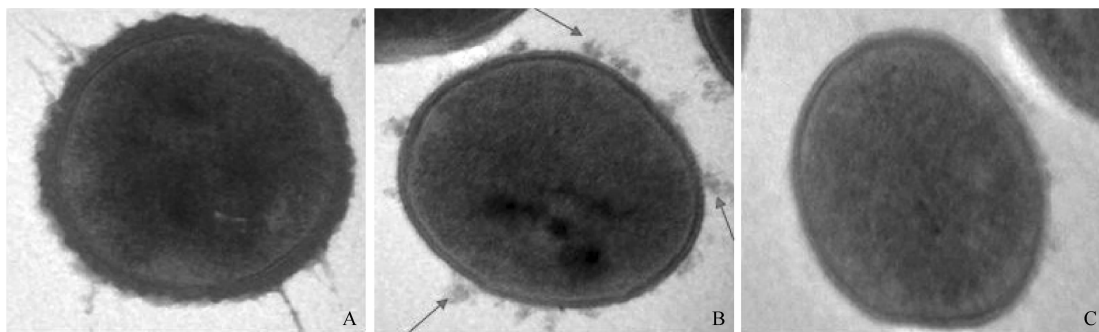


图 5 D39、D39 Δ 0873 及 D39 Δ 0873 + 0873 菌电镜形态 (100000 \times)

Fig. 5 Transmission electron microscope (TEM) morphology of *S. pn* D39, D39 Δ 0873 gene knockout mutant containing rescue plasmid and D39 Δ 0873 gene knockout mutant (100000 \times). A. D39 strain; B. D39 Δ 0873 gene knockout mutant containing rescue plasmid; C. D39 Δ 0873 gene knockout mutant.

3 讨论

我们构建该基因敲除的缺失菌株,结果显示基因敲除后,其生理形状发生很大改变。在体外进行培养时,发现缺失菌生长明显减缓,菌链变短,荚膜多糖合成障碍。小鼠毒力实验显示,缺失菌毒力较野生菌株明显下降。荚膜多糖是肺炎链球菌的最重要的毒力因子之一,无荚膜菌株较有荚膜菌株毒力会明显减弱。肺炎链球菌自身通过在转录、翻译及翻译后修饰水平对荚膜多糖的表达量进行调节,是其适应不同的宿主环境选择压力的重要工具^[6]。

目前的研究显示荚膜多糖合成基因簇主要位于 *dexB* 基因与 *aliA* 基因之间^[7],除此之外也还有其他的一些如荚膜多糖前体合成基因,如 *GlaU*、*Pgm* 能影响荚膜多糖合成^[8-9],但尚不清楚还有那些基因影响荚膜的合成。通过本次研究,发现 *SPD0873* 不仅影响了肺炎链球菌的增值能力也影响到了荚膜合成,是一个新的毒力因子,但其调控机制尚需进一步研究。

基因敲出是研究目的基因(蛋白)功能的常用方法,但基因 DNA 缺失可能会由于基因极性效应导致上下游基因表达改变,而引起一些细菌生物学性

状改变,因此,为了明确上述生物学性状改变是由于 spd0873 基因缺陷而产生的效应,还需对其基因进行回复突变验证。在本次研究中,我们运用穿梭质粒为载体构建了 spd0873 的拯救质粒,将其转入缺失菌中,得到带有拯救质粒的缺失菌株。从研究结果可以看出,我们所构建的带有拯救质粒的缺失菌株能够高水平的表达 spd0873 基因,菌株的生长增殖、荚膜合成及毒力等生物学性状都得到了部分回复,这说明 SPD0873 的确是一个影响肺炎链球菌的增殖能力和荚膜合成的毒力因子。

但本研究构建的带有拯救质粒的缺失菌株相关性并未完全回复至野生菌株水平,这可能与我们所采用的 PMV158 质粒是一种多拷贝质粒有关。目前用于基因功能研究的拯救质粒主要有两种类型:一种是把需表达的目的基因克隆到多拷贝复制性质粒中,然后转入肺炎链球菌缺失菌株中,通过质粒上的启动子诱导表达目的基因;另一种是将目的基因克隆于在肺炎链球菌中不能复制的质粒(自杀质粒)中,这种拯救质粒能够等位整合到细菌基因组中,其目的基因的表达调控与野生菌株相同。但后面这种拯救质粒的整合可能对目的基因上下游产生极化效应,导致相关基因表达水平改变而产生一些未知生理效应。因此,我们采用第一种拯救质粒验证基因的功能,通过麦芽糖启动拯救质粒中的目的基因表达^[10]。由于目的基因的表达不受细菌本身相关基因的调控,因此,它可能会导致 spd0873 基因表达的时间及水平与野生菌株不同,从而导致细菌的生物学性状不能完全与野生菌一致。

参考文献

- [1] Balakrishnan I, Crook P, Morris R, Gillespie SH. Early predictors of mortality in *pneumococcal bacteraemia*. *Journal of Infection*, 2000, 40(3):256-261.
- [2] Chiang SL, Mekalanos JJ, Holden DW. In vivo genetic analysis of bacterial virulence. *Annual Review of Microbiology*, 1999, 53:129-154.
- [3] 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(1):58-65.
- [4] Guiral S, Hénard V, Laaberki MH, Granadel C, Prudhomme M, Martin B, Claverys JP. Construction and evaluation of a chromosomal expression platform (CEP) for ectopic, maltose driven gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, 2006, 152 (Pt 2):343-349.
- [5] Lee MS, Morrison DA. Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking Quorum sensing to competence for genetic transformation. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(16):5004-5016.
- [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(4):288-301.
- [7] Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA, Samuel G, Skovsted IC, Kalløft MS, Barrell B, Reeves PR, Parkhill J, Spratt BG. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 Pneumococcal serotypes. *PLoS Genetics*, 2006(2):262-269.
- [8] Mollerach M, López R, García E. Characterization of the galU gene of *Streptococcus pneumoniae* encoding a uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase: a gene essential for capsular polysaccharide biosynthesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 1998, 188(11):2047-2056.
- [9] Hardy GG, Magee AD, Ventura CL, Caimano, MJ, Yother J. Essential role for cellular phosphoglucomutase in virulence of type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 2001, 69(4):2309-2317.
- [10] Concepción N, Manuel E. Construction of the mobilizable plasmid pMV158GFP, a derivative of pMV158 that carries the gene encoding the green fluorescent protein. *Plasmid*, 2003, 49(3):281-285.

Influence of lysozyme-like protein on virulence and capsular polysaccharide synthesis of *Streptococcus pneumoniae*

Jian Huang¹, Xuemei Jiang², Meirong Huang¹, Xiaoliang Yang¹, Mingwei Liu¹, Hong Wang¹, Jianping Meng^{1*}

¹Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Laboratory of Clinical Diagnosis in Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China

²Chongqing Institute for Drug Control, Chongqing 401121, China

Abstract: [**Objective**] To study the biological character and pathogenic effect of a lysozyme-like protein in *Streptococcus pneumoniae*. [**Methods**] The gene knockout mutant was constructed by the long flanking homology polymerase chain reaction. The mutant containing rescue plasmid to complement the lysozyme-like gene was also constructed. The differences in biology and pathogenicity in D39 wild strain, gene knockout mutant and gene knockout mutant containing rescue plasmid were observed to identify the functions of the lysozyme-like gene. [**Results**] Compared with the wild strain, the gene knockout mutant had the characteristics of slower growth, declining virulence, and obviously reduced capsule polysaccharide synthesis. Complement experiment showed when the rescue plasmid was transformed into the mutant strain, the mRNA level of hypothetical lysozyme-like gene in the gene knockout mutant containing rescue plasmid was higher than that of the wild strain. Although the levels of virulence and capsule polysaccharide synthesis could be partly complemented compared with those of the gene knockout mutant, but not reached the levels in the wild strain. [**Conclusions**] The lysozyme-like protein, a new *Streptococcus pneumoniae* virulence factor, may regulate the proliferation and the capsular polysaccharides synthesis of *Streptococcus pneumoniae* to affect expression of virulence.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, lysozyme, virulence, reverse mutation, capsule

(本文责编:王晋芳)