

# 肺炎链球菌毒力基因体内荧光报告系统的构建\*

陈保德 尹一兵\*\* 张雪梅

(重庆医科大学医学检验系 重庆 400016)

**摘要:** 以绿色荧光蛋白 (GFP) 作为体内研究的分子探针, 将肺炎链球菌毒力基因与 *gfp* 融合构建肺炎链球菌自杀性荧光报告质粒, 利用同源重组的原理, 使 *gfp* 整合入肺炎链球菌基因组中, 建立体内研究肺炎链球菌基因表达的荧光报告系统, 并用荧光激发、生物学特征和生理活性测定等实验手段进行评价, 证实这一肺炎链球菌荧光融合表达系统可在体内外报告肺炎链球菌的毒力基因表达, 为进一步在体内分析和鉴定肺炎链球菌毒力因子的功能奠定基础。

**关键词:** 肺炎链球菌, 绿色荧光蛋白, 自杀质粒

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0055-05

## Construction, Expression and Evaluation of the System Reporting *Streptococcus pneumoniae* Virulent Gene by GFP *in vivo*

CHEN Bao-De YIN Yi-Bing\*\* ZHANG Xue-Mei

(The Faculty of Laboratory Medicine, ChongQing Medical University, Chongqing 400016)

**Abstract:** *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn*) is an opportunity pathogenic bacteria, environmental factors play a key role in the pathogenicity of *S. pn*. It is important to study virulent gene *in vivo*. The *S. pn* suicide plasmid containing *gfp* reporter was constructed by fusing the genes pneumolysin and *gfp*, in which *gfp* is an excellent molecule probe *in vivo*. The plasmid was integrated to No.22 *S. pn* by homologous recombination. The recombinant *S. pn* was gained and evaluated in aspects of fluorescence excitation, biological character and physio-activity. The results showed it is efficient and available to report the expression of virulent genes *in vivo* and *in vitro*, which will provide a new easy method for evaluating and screening the virulent genes of *S. pn in vivo*.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, Green fluorescent protein, Suicide plasmid

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*) 是一种条件致病菌, 在自然状态下能发生转化, 在肺炎链球菌的进化、变异和致病过程中环境因素起着关键作用<sup>[1]</sup>, 研究肺炎链球菌毒力基因的功能必须考虑宿主体内环境因素的影响。近几年, 绿色荧光蛋白 (GFP) 由于其发光作用不需要酶和底物参与, 发光蛋白对细胞没有毒性, 可以在活体组织、细胞内部直接检测, 因而用 GFP 作为分子探针, 在研究活细胞内蛋白质迁移变化以及跟踪观察病原微生物侵袭宿主细胞的分子过程中具有广泛的应用前景<sup>[2]</sup>。GFP 的发现为体内研究基因表达提供了一次新的发展机遇, 将 GFP 与体内表达技术 (*in vivo* expression technology IVET) 结合起来可以直观地定位分析毒力因子的功能<sup>[3]</sup>, 根据不同

\* 国家自然科学基金资助项目 (No.30170050)

Project granted by Chinese National Science Fund (No.30170050)

\*\* 联系人 Tel: 023-68485658, E-mail: yibingyin@21cn.com

收稿日期: 2003-11-28, 修回日期: 2004-01-15

条件下诱导荧光的差异表达建立起来的差异荧光诱导技术 (differential fluorescence induction DFI) 可以快速方便地在流式细胞仪上分选出表达新毒力基因的菌株<sup>[4]</sup>。本研究以 *gfp* 作为报告基因, 采用基因融合分析方法, 利用肺炎链球菌自然转化的特点, 建立体内研究肺炎链球菌基因表达的荧光报告系统, 并对这一系统进行评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** *S. pn22* 由日本鸟取医学院附属医院提供; pEVP3 和 pEGFP 质粒分别由美国 Illinois 大学 Morrison 教授和重庆医科大学罗云萍教授惠赠。

**1.1.2 试剂、培养基和实验动物:** 质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、DNA 连接试剂盒及各种内切酶购自大连宝生物公司; RNA 提取试剂盒、PCR 试剂和 RT-PCR 试剂购自上海生物工程技术公司; 引物合成及测序由上海博亚生物公司完成; 磷酸盐缓冲液 PBS (pH 7.2) 和各种培养基由本实验室配制; BABL/c 小鼠购自本校动物中心。

**1.1.3 PCR 引物:** PCR 引物见表 1。

表 1 各基因扩增所用引物序列。

名称	Sense primer	Antisense primer
primer 1	5' 'CGAGATCTGCAACTCAATCCAGGAACIT' 3	5' 'CCGAGCTCGAITTTTCTACCTTATCCCTCT' 3
primer 2	5' 'ATGGTACCAAGGGCGAGGAG' 3	5' 'TTACTTGTACAGCTCGTCCATG' 3
primer 3	5' 'CGAGATCTGCAACTCAATCCAGGAACIT' 3	5' 'TTACTTGTACAGCTCGTCCATG' 3
I6SrRNA 引物	5' 'ATAGCCGACCTGAGAGGGTGA' 3	5' 'TACAAGCCAGAGAGCCGCTTT' 3

### 1.2 方法

**1.2.1 pEVP3-*gfp* 质粒的构建与鉴定:** *Bam*HI、*Eco*RV 双酶切 pEVP3; *Bam*HI、*Stu*I 双酶切 pEGFP, 电泳分离回收目的片段, T4DNA 连接酶连接构建 pEVP3-*gfp* 质粒。*Bam*HI 单酶切鉴定。

**1.2.2 pEVP3-*ply-gfp* 质粒的构建与鉴定:** 以 *S. pn22* 基因组 DNA 为模板, 设计并合成一对引物 (primer 1) 扩增 *S. pn* 溶血素基因 (*ply*) 的编码区 (去掉终止密码), 并在上游和下游引物中分别引入 *Bgl*II 和 *Aat*II 酶切位点。*Bgl*II 和 *Aat*II 分别双酶切 pEVP3-*gfp* 质粒和 *ply* 片段, T4DNA 连接酶连接构建 pEVP3-*ply-gfp* 质粒。*Bgl*II 和 *Xba*I 双酶切鉴定, 同时进行 PCR 和测序鉴定。PCR 反应参照《分子克隆》实验指南。

**1.2.3 pEVP3-*ply-gfp* 质粒转化感受态 *S. pn* 及重组菌的鉴定:** 将 *S. pn* 培养于 CTM 培养基中至  $OD_{600} = 0.1$  左右, 加入 CSP (感受态刺激因子) 和 pEVP3-*ply-gfp* 质粒于 37℃ 孵育 45~90 min, 在含氯霉素的血平板上筛选阳性重组菌落。PCR 鉴定: 提取重组 *S. pn* DNA 作模板 (1 $\mu$ L), 以 primer2 为引物扩增 *gfp*, 操作参照《分子克隆》。

**1.2.4 重组和未重组 *S. pn* 的生物学特征和生长曲线比较:** 生物学特征鉴定——菌落形态和 *S. pn* 鉴定实验。生长曲线的绘制——挑取两组细菌血平板上大小一致的单个菌落接种于 C+Y 培养基中 37℃ 培养, 从菌密度为  $OD_{550} = 0.01$  开始, 每隔 1 h 或 2 h 测定一次菌密度, 绘制生长曲线。同时以 PBS 重悬各时间点的细菌, 以激发波长 488 nm, 发射波长 510 nm, 在荧光分光光度计上测定荧光强度, 绘制时间-荧光曲线。

**1.2.5 重组 *S. pn* 体外荧光观察:** 细菌培养 6~7h 后离心, PBS 重悬, 再浓缩涂片置于荧光显微镜下, 蓝光激发, 以 10 $\times$ 20 的视野观察荧光并照相。

**1.2.6 RT-PCR 鉴定重组 *S. pn* 中融合基因 *ply-gfp* 的表达:** 提取 3 mL 重组和未重组 *S. pn* 总 RNA, 以随机引物逆转录, 获得的 cDNA 为模板; 分别用上述两对引物的上游和下游引物组合, 扩增 *ply*、*gfp*、*ply-gfp* 和 16SrRNA, 操作参照《分子克隆》。

**1.2.7 重组 *S. pn* 体内荧光观察:** 取 0.1 mL  $OD_{620} = 0.6$  的重组和未重组 *S. pn* 菌液注入实验组和对照组小鼠的腹腔, 每组 6 只小鼠, 分别于 24、48 和 72 h 各处死 2 只小鼠, PBS 洗脱腹腔液, 浓缩后置荧光显微镜下观察并照相。

## 2 结果

### 2.1 pEVP3-gfp 质粒的构建和鉴定

由 *gfp* 与 pEVP3 重组构建的 pEVP3-gfp 质粒维持了原 pEVP3 的氯霉素抗性, 但破坏了 *LacZ* 报告基因。由于 *EcoRV* 和 *StuI* 位点连接后产生了新的 *BamHI* 酶切位点, 选用 *BamHI* 单酶切鉴定, 预期将产生 5.2 kb + 0.8 kb 两个片段, 而不是 6.0 kb 一个片段。酶切结果证实 pEVP3-gfp 质粒构建成功 (图 1)。

### 2.2 pEVP3-*ply-gfp* 质粒的构建与鉴定

*S. pn* 溶血素基因 (*ply*) 的编码区定向克隆入 pEVP3-gfp 载体中获得 pEVP3-*ply-gfp* 质粒。选择 *ply* 片段 5' 端的 *BglII* 和 *gfp* 片段 3' 端的 *XbaI* 进行酶切鉴定, 将产生 5.1 kb + 2.2 kb 两个片段。同时进行 PCR 和质粒测序鉴定, 而质粒测序结果与预期序列一致。因此通过酶切、PCR 及测序证实 pEVP3-*ply-gfp* 质粒构建成功 (图 2)。

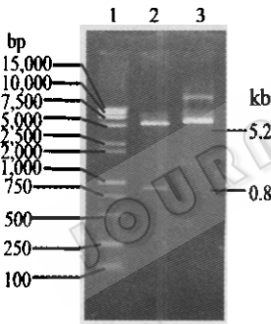


图 1 酶切鉴定质粒 pEVP3-gfp

1 DNA marker DL2000 + 15000, 2 pEVP3-gfp/  
*BamHI*, 3 pEGFP-gfp plasmid

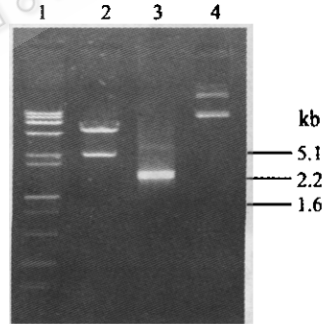


图 2 酶切和 PCR 鉴定质粒 pEVP3-*ply-gfp*

1 DNA marker DL2000 + 15000, 2 pEVP3-*ply-gfp*/  
*BglII* + *XbaI*, 3 *ply* fragment/PCR, 4 pEVP3-*ply-gfp*  
plasmid

### 2.3 重组肺炎链球菌菌株的建立及鉴定

pEVP3-*ply-gfp* 转化 *S. pn* 后整合到 *S. pn* 基因组中, 这使 *S. pn* 具有氯霉素抗性。经氯霉素筛选阳性菌落提取 DNA, 以 primer2 作 PCR 反应, 电泳出现预期的 0.7kb 条带 (*gfp*), 证实 *S. pn* 成功整合了 pEVP3-*ply-gfp* 质粒 (图 3)。

### 2.4 重组与未重组肺炎链球菌表现相同的生物学特征

血平板上呈半透明、光滑、细小菌落, 周围可见草绿色溶血环。胆汁溶菌实验阳性、菊糖分解实验阳性、奥普托辛敏感实验阳性。

### 2.5 重组与未重组肺炎链球菌的生长曲线

见表 2。

由表中可见, 重组肺炎链球菌的生长趋势与野生型一致, 基因的重组并未影响其

自然生长。

表2 重组与未重组肺炎链球菌在 550 nm 下的光密度值

t (h)	0	2	4	5	6	7	9
未重组 <i>S. pn</i>	0.010	0.030	0.127	0.297	0.827	0.794	0.790
重组 <i>S. pn</i>	0.010	0.029	0.121	0.286	0.804	0.781	0.779

## 2.6 重组肺炎链球菌时间——荧光曲线

见表3, 在 488 nm 波长激发下, 重组肺炎链球菌的荧光强度在 4 h 后显著高于野生型的荧光强度, 此实验结果表明重组肺炎链球菌能够表达荧光蛋白。

表3 重组与未重组肺炎链球菌在 488 nm 波长激发下的荧光强度

t (h)	0	2	4	5	6	7	9
未重组 <i>S. pn</i>	6.1	8.0	15.6	19.5	19.8	19.4	18.7
重组 <i>S. pn</i>	6.0	7.8	18.3	24.2	36.7	37.0	36.5

## 2.7 RT-PCR 证实 *ply-gfp* 融合基因的表达

为了从转录水平进一步证实 *ply-gfp* 融合基因的表达, 我们设计了 3 对引物, 以重组和未重组的 *S. pn* cDNA 为模板, 分别扩增 *ply*、*gfp*、*ply-gfp*, 重组 *S. pn* 得到 1.6kb、0.7kb、2.2kb 3 种片段, 而未重组的 *S. pn* 只得到 1.6kb 一条片段 (图4)。

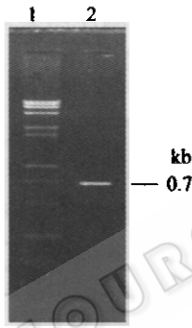


图3 以重组 *S. pn* 基因组为模板扩增 *gfp* 基因片段结果

1 DNA marker DL2000 + 15000, 2 *gfp* fragment / PCR

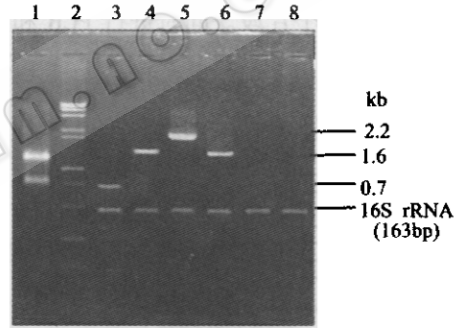


图4 RT-PCR 扩增重组与未重组 *S. pn* 的基因 *ply*、*gfp*、*ply-gfp*

1 Total RNA of *S. pn*, 2 DNA marker DL2000 + 15000, 3 Re-*S. pn* RNA/RT-PCR with primer 2, 4 Re-*S. pn* RNA/RT-PCR with primer 1, 5 Re-*S. pn* RNA/RT-PCR with primer 3, 6 Un-*S. pn* RNA/RT-PCR with primer 1, 7 Un-*S. pn* RNA/RT-PCR with primer 2, 8 Un-*S. pn* RNA/RT-PCR with primer 3

## 2.8 重组肺炎链球菌体外激发荧光

荧光显微镜下可见许多长短不一, 链状, 发绿色荧光的物质, 对应在白光灯下可见细菌成链状, 有的链长, 有的链短, 也有细菌两两成对排列。用同样条件下培养的未重组 *S. pn* 作对照, 镜下未见发光细菌。根据 2.7 结果, 重组肺炎链球菌表达了 *ply*、*gfp*、*ply-gfp* 基因, 而未重组的肺炎链球菌无 *gfp*、*ply-gfp* 基因表达, 荧光显微镜的观察结果与之一致, 表明 GFP 蛋白可以在体外报告毒力基因 *ply* 的表达。

## 2.9 重组肺炎链球菌体内激发荧光

由于 *S. pn* 22 的毒性不强, 我们选择易于发生感染的腹腔注射途径感染小鼠。经不

同时间的体内诱导,我们发现重组 *S. pn* 在体内能激发明亮荧光,在 24 h 最强。通过 RT-PCR 证实 *gfp*、*ply-gfp* 的基因表达,此实验结果表明 GFP 能在体内报告毒力基因 *ply* 的表达。

### 3 讨论

自杀质粒作为一种载体工具被广泛地应用于基因分析技术中<sup>[5]</sup>。1995年, Morrison 等为研究 *S. pn* 毒力基因的功能构建了 pEVP3 自杀质粒<sup>[6]</sup>。该质粒含有一个能自主表达的氯霉素抗性基因和一个 *LacZ* 报告基因。由于只能在体外筛选, *LacZ* 作为报告表达的标记存在其本身的缺陷性。为此,我们选用 *gfp* 代替 *LacZ* 作报告基因构建了 pEVP3-*gfp* 和 pEVP3-*ply-gfp* 质粒。

pEVP3-*ply-gfp* 质粒载体中的融合基因 (*ply* 和 *gfp*) 均没有自己的启动子,只有整合入 *S. pn* 染色体中才能在 *ply* 启动子的调控下表达。由于 *gfp* 在 *ply* 的 3' 端,统一受 *ply* 启动子的调控,所以能真实反映 *ply* 的表达情况。*ply* 和 *gfp* 在融合前是两个独立的基因,分别表达溶血素和绿色荧光蛋白。*ply* 是以 *S. pn* 基因组为模板扩增出来的 PCR 产物,*gfp* 来源于 pEGFP,是绿色荧光蛋白的 cDNA。为了使融合基因重组后能在 *S. pn* 中完整表达,我们选择了高保真的 DNA 聚合酶,降低错配几率,在设计 PCR 引物和选择酶切位点时保证二者读码框的一致性和完整性。这包括从 *ply* 5' 端的起始密码 (ATG) 到 *gfp* 3' 端的终止密码 (TAA) 之间不能有终止密码子且不产生移码突变。

由于 *S. pn* 具有自然转化的特性, pEVP3-*ply-gfp* 质粒成功构建后,经 CSP (感受态刺激因子) 诱导即可与 *S. pn* 菌发生重组。重组后 *ply-gfp* 融合基因能不能表达具有功能活性的蛋白质是关键。在原核基因融合表达载体中有时会出现所表达的外源蛋白质没有活性,这可能是由于其折叠方式的不正确所造成。蛋白质的正确折叠除与细菌本身的蛋白质折叠酶有关,还与环境等其它多种因素有关<sup>[7]</sup>。据文献报道野生型 GFP 在 37℃ 培养难以激发荧光,其适宜的表达环境是在 28℃,中性,有氧的条件下,而增强型 GFP 较少受此条件限制<sup>[2]</sup>。在实验过程中,为了减少 GFP 受培养基的影响,我们将在 C+Y 中培养的 *S. pn* 离心后用 PBS 重悬,发现荧光明显增强。体内动物实验中,重组 *S. pn* 在 24 h 也激发出了明亮荧光,但由于 *S. pn*. 22 的毒性较弱,细菌很快被小鼠的免疫系统清除掉,荧光的强度和数量较少。当然,我们也可以在活体组织上,通过激光扫描共聚焦显微镜直接观察荧光,这在我们的后继工作中要涉及到。

实验证明重组 *S. pn* 可在体内由 GFP 报告毒力基因的表达,表明肺炎链球菌荧光融合表达系统可用于体内研究 *S. pn* 致病机制。重组菌具有 *S. pn* 典型的生物学特性,且重组菌和未重组菌具有一致的生长趋势 (生长曲线),即基因 *gfp* 的融合并不影响肺炎链球菌的生物学特性。

### 参考文献

- [1] Dowson C G, Bartsch V, King S. Soc Appl Bacteriol Symp Ser, 1997, 26: 42-51.
- [2] Zimmer M. Chem Rev, 2002, 102 (3): 759-81.
- [3] Acebo P, Nieto C, Corrales M A, et al. Microbiology, 2000, 146 ( Pt 6): 1267-1273.
- [4] Marra A, Asundi J, Bartilson M, et al. Infect Immun, 2002, 70 (3): 1422-1433.
- [5] 徐建国主编. 分子医学细菌学. 北京: 科学出版社, 2000. 283-292.
- [6] Claverys J P, Dintilhac A, Pestova E V. Gene, 1995, 164: 123-128.
- [7] Weaver R F. Molecular Biology. McGraw-Hill Companies, Inc, 2000, 83-90