

带 GFP 标记嗜肺军团菌的构建和在细胞感染中的应用

熊丽娜^{1,2} 赵红波² 莫自耀^{2*} 石磊¹

(1. 华南理工大学 广东 广州 510641)

(2. 广州医科大学附属第一医院 广州呼吸疾病研究所 呼吸疾病国家重点实验室 广东 广州 510120)

摘要:【目的】为能实时直观了解嗜肺军团菌感染细胞的过程, 研究细菌在细胞内的变化及其与宿主细胞间的相互作用关系。【方法】通过基因敲除、克隆回补等重组构建绿色荧光蛋白(GFP)稳定高表达的嗜肺军团菌株, 利用该菌株建立小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的感染模型。【结果】通过荧光显微镜可实时观察细菌感染细胞的全过程, 包括细菌在细胞内的形态变化、增殖和裂解宿主细胞等。【结论】重组菌可替代野生菌株在细胞感染中应用, 为直观研究嗜肺军团菌与被感染细胞之间的相互作用关系, 以及进行相关药物模型的制备、药物筛选、耐药机制研究等提供了新的手段。

关键词: 嗜肺军团菌, 绿色荧光蛋白, 感染

Construction and application of green fluorescent protein-tagged *Legionella pneumophila* in cell infection

XIONG Li-Na^{1,2} ZHAO Hong-Bo² MO Zi-Yao^{2*} SHI Lei¹

(1. South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510641, China)

(2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Institute of Respiratory Disease, State Key Laboratory of Respiratory Disease, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: [Objective] To study the infection by *Legionella pneumophila* and the relative biological activities between bacteria and host cells in real time. [Methods] We constructed a strain of *L. pneumophila* that can stably express green fluorescent protein by method of gene knockout and retro-complementation, and established an infection model with murine Raw264.7 macrophage. [Results] The recombinant strain was applied in cell infection successfully. The entire process of infection can be observed in real time by fluorescence microscope, including the variety of bacterial cell morphology, intracellular proliferation, and lysing the host cells. [Conclusion] Our result provides a new mean to study the relationship between *L. pneumophila* and infected cells, the preparation of some models related to the drugs, and the drug screening and the mechanism of drug resistance.

Keywords: *Legionella pneumophila*, Green fluorescent protein, Infection

基金项目: 国家重点实验室自主选题基金项目

*通讯作者: Tel: 86-20-34297736; ✉: moziyao@163.net

收稿日期: 2014-02-28; 接受日期: 2014-04-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-30

军团菌为环境中广泛分布的条件致病菌,主要通过吸入方式进入体内,以感染肺泡巨噬细胞等完成致病过程^[1]。对于军团菌在细胞内增殖的过程及相关机制一直是学者们关注的重点。研究表明,军团菌主要通过 dot/icm (IV型)分泌系统经向宿主细胞分泌多种效应蛋白进行细胞感染、胞内增殖、逃避溶酶体的消化以及裂解宿主细胞^[2],对军团菌病最主要的致病菌嗜肺军团菌的全基因组序列也已经测定完成,对相关基因的定位和功能也有了一定了解^[3-4]。然而对于军团菌在不同环境下如何感染细胞、增殖和释放,以及所需的相关条件,细菌和宿主状态,感染过程中细菌与宿主间的相互作用等仍不完全明晰。另外,由于军团菌在恶劣的条件下会进入活的非可培养状态,传统培养法对未标记的细菌难于开展定位、溯源和复苏等,示踪菌的制备可带来更直观、简捷和可行的研究手段。

绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)是一种广泛应用于生物学研究的标签蛋白^[5]。Köhler 等曾报道以 *Pmip* 为启动子引入 *gfp* 作为嗜肺军团菌蛋白表达强度的报告基因^[6]。本研究选择常用的嗜肺军团菌标准株 ATCC33152,利用同源重组方法获得胸腺嘧啶缺陷株,缺陷株的回补载体同时含有军团菌强启动子 *Pmip*,经启动下游增强型绿色荧光蛋白基因,获得了能够稳定高表达绿色荧光蛋白的嗜肺军团菌株。该重组菌株与野生株相比各项生物指标如菌落形态,生长周期和对培养条件的要求及胞内增殖曲线等均无明显改变。可在荧光显微镜下直接观察其对巨噬细胞感染过程和胞内的增殖裂解细胞等各个阶段。由于菌株生长对质粒有依赖性,重组菌株经过无筛选压力反复传代和胞内增殖 72 h 仍能在荧光显微镜下保持明亮的绿色。带 GFP 标记的嗜肺军团菌的重组成功和相关细胞感染模型的建立,为细菌耐药、药物筛选、相关基因功能定位等研究提供新的平台和帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞株:嗜肺军团菌血清 1 型菌株 ATCC33152 由广州市疾病预防控制中心提供;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自 TaKaRa 公司;质粒 pJB908(*gfp*)*Pmip* 和 pBRDX 为中山大学陆勇军教授惠赠, pJB908(*gfp*)*Pmip* 具氨苄青霉素抗性基因 *gfp* 基因上游含编码胸腺嘧啶生物合成基因,自杀质粒 pBRDX 为氯霉素抗性,同时含蔗糖致死基因和甲硝唑致死基因;小鼠巨噬细胞 Raw264.7 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 培养基:军团菌培养基 BCYE 和液体培养基 AYE 参考 Feeley 等^[7-8],胸腺嘧啶缺陷型菌株培养基加入 100 mg/L 胸腺嘧啶(Sigma)^[9];细胞培养基 DMEM/High glucose 和 FBS 购自 Thermo 公司;PBSS 缓冲液 2 mmol KCl, 1 mmol CaCl₂, 0.5 mmol MgCl₂, 1 mmol Tris·HCl, 定容至 1 L,用 KOH 调 pH 至 7.0, 1 \times 10⁵ Pa 灭菌 30 min 后室温保存。

1.1.3 主要试剂和仪器:PrimeStar HS DNA Polymerase、DL2000 DNA Marker、DL15000 DNA Marker, TaKaRa; T100TM Thermal Cycler PCR 仪、Gene Pulser X-Cell 电穿孔仪, Bio-Rad。

1.2 构建军团菌 *thyA* 缺陷株

利用自杀质粒同源重组的特性,将嗜肺军团菌 *thyA* 基因截短突变。操作如下:Primer5 设计两对引物(表 1),序列从 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>网站上获得。以嗜肺军团菌 ATCC33152 基因组为模板,以 ThyA-F1 和 ThyA-F2 为引物扩增 *thyA* 基因左侧同源臂, ThyA-F3 和 ThyA-F4 为引物扩增基因右侧同源臂,再以回收的左右同源臂为模板,以 ThyA-F1 和 ThyA-F4 为引物进行融合 PCR,融合片段经双酶切连入质粒 pBRDX 中,得到 *thyA* 基因截短突变的敲除载体 pBRDX-*thyA*⁻。

将 pBRDX-*thyA*⁻电激转化入军团菌中,转化方法参照 Mintz 等^[10],含氯霉素的培养基筛查一次同源重组,挑取平板上的单菌落 PCR 验证,阳性克

表 1 *thyA* 基因敲除引物
Table 1 Primers used in knockout *thyA* gene

引物名称 Name of primers	保护碱基 Protecting bases	酶切位点 Restriction sites	序列 Sequences (5'→3')
ThyA-F1	CCG	CTCGAG	AGCTGCGACCGTAAGGAG
ThyA-F2*			<u>ACCACTAAAAAACTGCATACG</u> GGGGGAGATTGTCATTTGTAT
ThyA-F3*			<u>ATACAAATGACAATCTCCCCC</u> CGTATGCAGTTTTTTAGTGGT
ThyA-F4	CGC	GGATCC	CGCCTGGCTCTTTTGCC

注: *带有下滑线序列为两个引物的同源互补序列。

Note: * The homology complementary sequences of two primers are labeled by underline.

菌子接种于 AYE(T)中培养 24 h, 梯度稀释涂布于含 200 mg/L 甲硝唑的 BCYE(T), 以生长于甲硝唑平板上的单菌落为模板, 以 ThyA-F1 和 ThyA-F4 为引物 PCR 检测, 阳性产物经基因测序确定。经序列比对, 挑选稳定重组子于 -80 °C 保存备用。

1.3 *gfp* 稳定表达菌株构建

质粒 pJB908(*gfp*)*Pmip* 电转化上述重组子, 涂布于含 75 mg/L 氨苄青霉素的 BCYE 培养基上, 37 °C、5% CO₂ 培养 4-5 d, 在氨苄青霉素和胸腺嘧啶双重筛选压力下, 阳性转化子在可见光下呈现墨绿色, 荧光显微镜蓝光下可见明亮的绿色荧光。为验证转化子稳定性, 经多达数十次平板培养传代, 液体培养传代及胞内增殖肉眼和荧光显微镜分别观察转化子的生长状况和荧光强度。平板培养传代每 4 天挑取平板上单菌落稀释涂板, 液体培养传代每天吸取 100 μL 菌液转接于新鲜的 5 mL AYE 中。细胞感染过程中, 在 0、12、24 h 用荧光显微镜观察细菌荧光强度同时裂解细胞涂布 BCYE 平板, 肉眼观察平板上细菌的颜色和生长状态。

1.4 菌体生长曲线测定

分别挑取嗜肺军团菌 ATCC33152 和经数十次传代的 ATCC33152*thyA*-pJB908(*gfp*)*Pmip* 单菌落于 5 mL AYE 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养过夜后取等量菌体转接至 250 mL AYE, 37 °C、220 r/min 继续培养, 定时测定菌体密度。

1.5 军团菌感染 Raw264.7 细胞株及胞内增殖曲线测定

军团菌感染巨噬细胞参照 Wright 等方法^[11]。

巨噬细胞以 2×10^6 /孔铺 6 孔板。挑取 BCYE 培养基上培养 48 h 的军团菌单菌落至 5 mL AYE 培养基中并调节初始 OD 约为 0.1, 37 °C、220 r/min 振荡培养 24 h, 根据 OD₆₀₀ 值调节细菌浓度, 按感染复数(MOI)为 10 感染巨噬细胞。共培养体系在室温 800×g 离心 10 min, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 45 min, 移除含菌液的培养基, 加入含 200 mg/L 的硫酸庆大霉素的新鲜 DMEM 培养基, 相同条件下, 处理 1 h 杀死细胞外的军团菌。移除培养基, PBS 轻轻吹洗 5 次, 加入含 3% FBS 的 DMEM 培养。按不同时间用镊子取片, PBS 冲洗 5 次, 倒扣于洁净的载玻片上, 在荧光显微镜蓝光下观察细胞内军团菌生长和增殖状态。

测定胞内增殖曲线时, 巨噬细胞以 5×10^4 /孔铺 24 孔板, 感染方法与感染复数不变, 按 0、12、18、24 h 时间点, 吸出孔内培养基, 加入 500 μL 灭菌的超纯水, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 10 min, 取出 24 孔板用枪反复吹吸孔底数十次, 转移含菌水至 1.5 mL 离心管中, 向孔内再次加入 500 μL 灭菌的超纯水冲洗孔底, 合并至上述离心管中, 室温涡旋振荡 3 min, 梯度稀释每样 3 份涂布 BCYE 平板, 37 °C、5% CO₂ 培养 4-5 d 后单菌落计数。

2 结果与讨论

2.1 构建军团菌 ATCC33152*thyA* 敲除株和 pJB908(*gfp*)*Pmip* 的转染

细菌在细胞感染过程中处于无抗性压力条件下, 含有 *gfp* 的质粒可能会在细菌增殖过程中丢失。

为使质粒在 72 h 或更长感染周期内也能稳定复制和表达,尚需要除抗生素以外的筛选压力。质粒 pJB908(*gfp*)*Pmip* 在绿色荧光蛋白基因的上游含有编码胸腺嘧啶生物合成蛋白基因,重建胸腺嘧啶基因敲除株可解决上述问题。质粒 pBRDX 由 pEA75 衍生而来,含有用于筛选的氯霉素抗性基因(*Cm^r*)和用于反筛的甲硝唑致死因子(*redX*),可分别用于第一次和第二次同源重组筛查^[12]。*thyA* 基因两端同源序列扩增及融合 PCR 结果如图 1 中 A 和 B 所示,两端同源序列大小为 740 bp 左右,经融合得到 1 480 bp 左右的片段,说明缺失片段构建成功。pBRDX 空载体约为 5 700 bp,插入融合片段后约为 7 200 bp,载体和重组质粒单酶切结果如图 1C

所示。由于自杀质粒的特性,重组载体将自身包括截短的 *thyA*⁻ 重组到军团菌染色体上,阳性菌株带有氯霉素抗性,以 ThyA-F1 和 ThyA-F4 为引物 PCR 扩增,阳性结果会出现两条电泳条带,如图 2A 中 3 号样品。将上述阳性菌株在无抗性条件下培养,理论上会进行第二次同源重组,造成质粒的丢失。以 ThyA-F1 和 ThyA-F4 为引物,甲硝唑平板上的单菌落进行菌落 PCR,电泳结果如图 2B 所示,7 号为阳性结果。回收阳性片段测序进行比对,确定缺失片段与敲除片段吻合。嗜肺军团菌 ATCC33152*thyA*⁻ 在 BCYE 平板上不能生长,经在培养基中加入胸腺嘧啶后,菌株生长恢复正常,说明胸腺嘧啶基因敲除株构建成功。

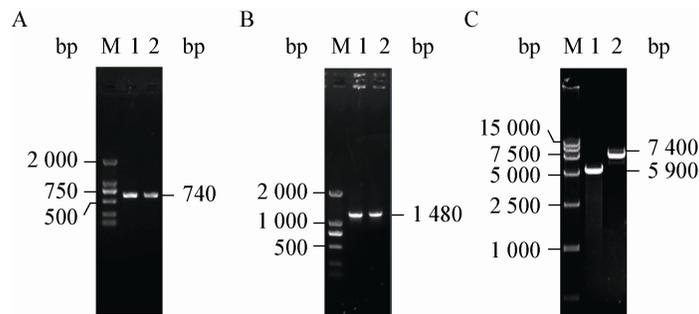


图 1 PCR 扩增结果及载体电泳图

Figure 1 Electrophoretic picture of PCR products and plasmid vector

注: A: *thyA* 基因两端同源臂扩增结果。1: *thyA* 基因左侧同源序列; 2: *thyA* 基因右侧同源序列。B: 同源臂融合结果 1、2 号同为左右侧同源臂融合序列。C: 载体单酶切电泳图。1: pBRDX *Bam*H I 单酶切; 2: pBRDX-*thyA*⁻ *Bam*H I 单酶切。

Note: A: Amplification of homology arms of the *thyA* gene. 1: Homologous sequence at the left of *thyA* gene; 2: Homologous sequence at the right of *thyA* gene. B: Fusion products of homology arms. 1 and 2 was the fusion of the left and right homology sequences. C: Electrophoretic picture of plasmid digested by *Bam*H I. 1: pBRDX digested by *Bam*H I, 2: pBRDX-*thyA*⁻ digested by *Bam*H I.

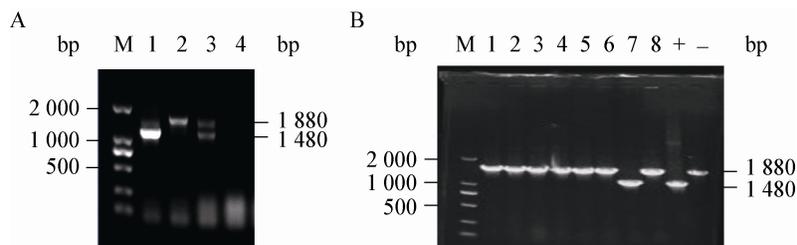


图 2 同源重组 PCR 产物凝胶电泳分析

Figure 2 Electrophoretic analysis of homologous recombination PCR products

注: A: 一次同源重组 PCR 检测结果, 1-4: 氯霉素平板上的单菌落; B: 二次同源重组 PCR 检测结果, 1-8: 甲硝唑平板上的单菌落。+, -: 正负对照。

Note: A: Detection of first homologous recombination PCR results. 1-4: Single colonies on the plates containing chloramphenicol. B: The second homologous recombination PCR results. 1-8: Single colonies on the plates containing metronidazole. +, -: The positive and negative control.

质粒 pJB908(*gfp*)*Pmip* (图 3)由 pMMB66EH 衍生而来, 后者的多克隆位点 *Xba* I 与 *Pst* I 酶切位点之间插入来自质粒 pKEN 的绿色荧光蛋白基因 *gfpmut*, *Bam*H I 和 *Xba* I 之间插入来自嗜肺军团菌 ATCC33152 的 *mip* 启动子^[6], *mip* 为感染增强因子, 该质粒能在嗜肺军团菌 ATCC33152 中高表达绿色荧光蛋白, 但需要在选择性培养基上生长, 而在非选择性培养基上会发生质粒的丢失。将该质粒电转化 ATCC33152*thyA* 敲除株中, 可得到稳定高表达绿色荧光蛋白的菌株(图 4)。

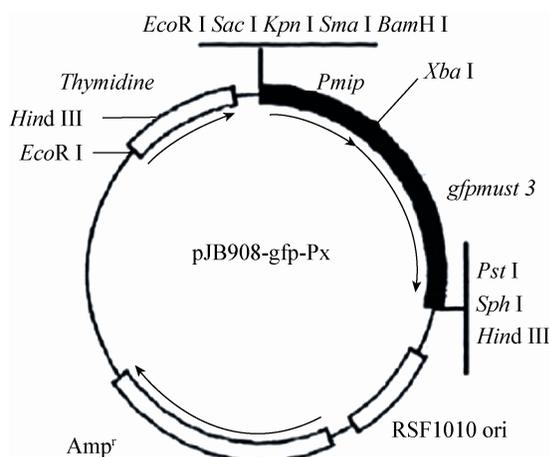


图 3 pJB908(*gfp*)*Pmip* 质粒示意图
Figure 3 Map of plasmid pJB908(*gfp*)*Pmip*



图 4 稳定表达绿色荧光蛋白菌株与原株对比
Figure 4 Compare between cloning and standard strain
注: 1, 2: ATCC33152*thyA*-pJB908(*gfp*)*Pmip* 菌株; 3, 4: ATCC33152pJB908(*gfp*)*Pmip* 菌株; 5, 6: ATCC33152 菌株。
Note: 1, 2: Strains of ATCC33152*thyA*-pJB908(*gfp*)*Pmip*; 3, 4: Strains of ATCC33152 pJB908(*gfp*)*Pmip*; 5, 6: Strains of ATCC33152.

ATCC33152 源于 1976 年美国费城暴发军团菌病的临床分离株, 一直作为模式菌株常用于探索军团菌感染原理, 评估水体抗菌剂效能, 研究巨噬细胞免疫过程及胞内菌与寄主间相互关系等^[13-16]。利用该菌株进行重组构建, 遗传背景清晰, 除表达 GFP 外, 许多相关感染过程和结果均可以与野生菌株直接进行比较。为相关的药物模型建立, 各类抗菌药物的筛选, 以及对临床一些耐药株的研究提供更直观简便的实验手段。与黄绍松等^[17]构建的菌株相比, 我们增加了必需基因的压力筛选, 便于其在细菌传代和细胞感染过程中绿色荧光蛋白的稳定表达。

2.2 表达 GFP 嗜肺军团菌的生长和对感染细胞的影响

基因工程改造后的细菌由于基因重排或突变以及报告蛋白可能带来的毒性等, 与野生株比较时往往产生较大的改变, 例如细胞感染能力、致病性、对环境的适应性等, 甚至带报告基因的重组株无法保持长期稳定的特性。本研究中的重组菌经过无抗性压力条件下数十代 BCYE 平板传代培养后, 所有的单菌落均一直保持明亮绿色, 稀释菌液涂片观察, 在荧光显微镜下荧光强度没有发生改变。无抗性压力条件下 AYE 传代数十次, 每次取 10 μ L 菌液涂片观察, 得到与平板培养相同的结果。重组菌在经过 10 次反复胞内增殖后, 荧光观察及平板培养观察荧光强度也没有出现差异。另外, 经过反复冻融复苏等, 其相关遗传性状也没有变化。通过连续观察重组菌株生长状态, 测定生长曲线等发现, ATCC33152*thyA*-pJB908(*gfp*)*Pmip* 与原嗜肺军团菌 ATCC33152 株相比, 在细菌形态、生长状况、生物量和稳定期存活能力上均没有明显差异(图 5 中重组菌为经过 20 次传代)。细胞感染不同时期胞内增殖情况比较也没有发现明显不同(图 6)。经过敲除 *thyA* 基因并通过 pJB908(*gfp*)*Pmip* 质粒回补以及质粒上 GFP 的高表达对细菌本身和细胞感染的周期没有产生影响。

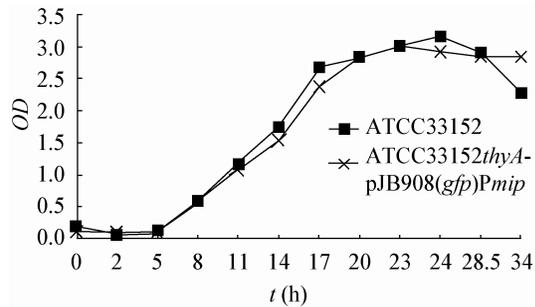


图5 菌株生长曲线

Figure 5 Comparison of growth curves

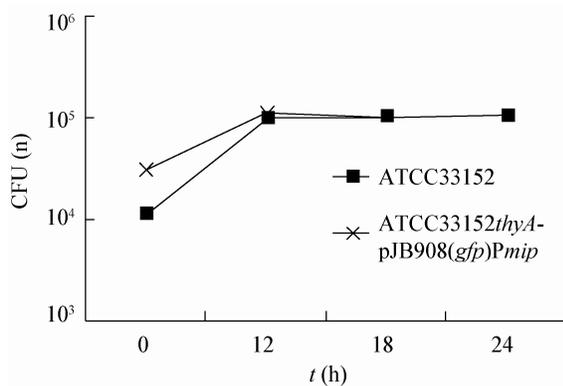


图6 菌株细胞内增殖曲线

Figure 6 Comparison of intracellular growth curves

2.3 在细胞内的增殖过程及相关意义

嗜肺军团菌感染巨噬细胞 Raw264.7 的感染周期可大致分为侵入细胞、形成囊泡、快速增殖、后期成熟和裂解宿主细胞等 5 个阶段。稳定期的嗜肺军团菌被巨噬细胞吞噬后,会形成一个吞噬泡,此时的军团菌呈不运动的长丝状(图 7A); 0–12 h 之间,细菌形成明显的复制囊泡并在其中生长繁殖(图 7B); 12–24 h 之间,细菌在囊泡内快速增殖并与周围囊泡逐渐融合形成一个或少数几个大囊泡,菌团发出不均匀的绿光,囊泡边界不规则(图 7C); 24 h 后进入后期成熟阶段,细菌在囊泡内的排布趋向规则,菌团与寄主内细胞器之间的边界变得很明显,菌团发出均匀明亮的绿光,军团菌变成短杆状并微微颤动,此状态为军团菌传播期的形态特征(图 7D); 感染晚期的巨噬细胞膜出现崩解,有规则外形的菌团也随之破裂,释放出细菌。细菌缓慢地运动,逐渐扩散开去(图 7E、F),至此嗜肺军团菌完成了一个感染周期。

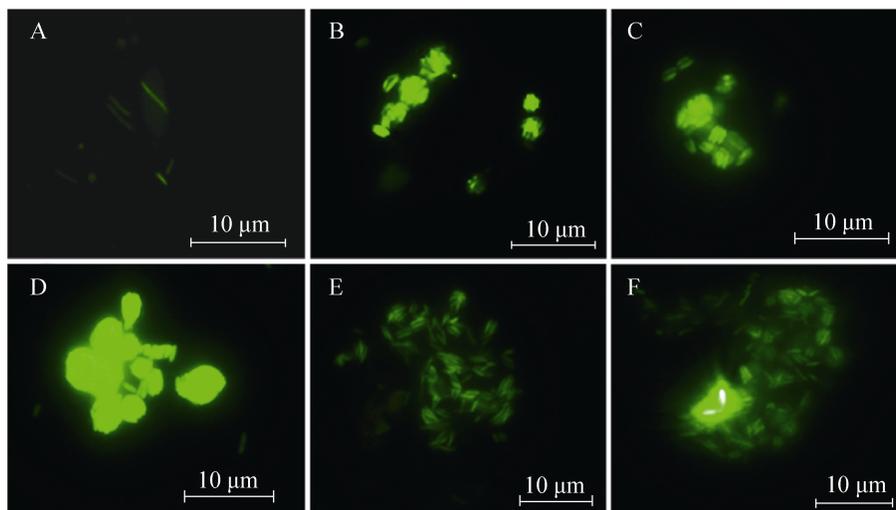


图7 绿色荧光蛋白指示的嗜肺军团菌感染巨噬细胞 Raw264.7 的过程

Figure 7 The process of infecting murine RAW 264.7 macrophages by *Legionella pneumophila* with green fluorescent protein

注: A: 感染早期; B: 繁殖期; C: 快速生长期; D: 传播期; E: 宿主裂解; F: 松散的细胞团。

Note: A: Early stage of infection; B: Proliferative stage; C: Rapid-growing stage; D: Dissemination period; E: Lysing the host cell; F: Loose cell cluster.

不同生长时期的嗜肺军团菌在感染巨噬细胞过程中胞内增殖情况变化较大,这可能与细菌的分化及其感染能力和毒力因子密切相关。传统培养法难于对感染过程中细菌和细胞形态变化进行观察和研究。带标记的重组菌可通过直观观察嗜肺军团菌在感染前、感染中以及裂解宿主细胞等不同过程,可以更加明确细菌与宿主细胞之间的相互关系和作用。同时,GFP 表达后不影响细菌的活性,且对其检测不使用任何抗体或酶底物等,可直接在荧光显微镜下直观观察感染过程,利于建立相关细胞如 THP-1、J774.1 及 A549 等细胞的感染模型,为嗜肺军团菌的相关致病机制研究,后期对各类抗菌剂作用时期和强度的评估及宿主-寄主相互作用关系的研究提供平台。

3 结论

研究表明,嗜肺军团菌已经成为全球第四大类社区获得性肺炎致病菌^[18],但对其致病机理仍不十分明确,需要辅以各种实验手段,以帮助了解其致病过程。本研究所制备的 ATCC33152 菌株,背景来源清晰,经重组构建后,能稳定高表达绿色荧光蛋白,为我们进行相关的细菌学研究提供了很好的示踪方法。同时,细菌本身生长及胞内增殖特性经过多次传代、冻融、复苏及胞内增殖并没有发生可检测的改变,能够在以后军团菌相关的如基因蛋白功能定位、细胞免疫通路、抗菌素以及环境消杀剂等研究中替代传统实验中应用的 ATCC33152。另外,在细胞感染过程中,由于不需染色处理就能直接进行观察,实时监测感染过程中细菌状态和增殖情况以及宿主细胞的状态等。为进一步了解军团菌的致病机制,明确细菌各基因功能定位,提供了简洁直观的研究手段,为今后相关药物模型制备,抗菌药筛选和临床治疗等提供帮助。

参考文献

- [1] Newton HJ, Ang DKY, van Driel IR, et al. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2010, 23(2): 274-298.
- [2] Hilbi H, Segal G, Shuman HA. Icm/Dot-dependent

- upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*[J]. Molecular Microbiology, 2001, 42(3): 603-617.
- [3] Chien M, Morozova I, Shi S, et al. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*[J]. Science, 2004, 305(5692): 1966-1968.
- [4] Rao C, Benhabib H, Ensminger AW. Phylogenetic reconstruction of the *Legionella pneumophila* philadelphia-1 laboratory strains through comparative genomics[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64129.
- [5] Harding CR, Schroeder GN, Reynolds S, et al. *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model[J]. Infection and Immunity, 2012, 80(8): 2780-2790.
- [6] Köhler R, Bubert A, Goebel W, et al. Expression and use of the green fluorescent protein as a reporter system in *Legionella pneumophila*[J]. Molecular and General Genetics MGG, 2000, 262(6): 1060-1069.
- [7] Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, et al. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1979, 10(4): 437-441.
- [8] Köhler R, Fanghänel J, König B, et al. Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(8): 4389-4397.
- [9] 郑晓聪. 嗜肺军团菌 clpP 基因功能研究[D]. 广州: 中山大学硕士学位论文, 2007.
- [10] Mintz CS. Gene transfer in *Legionella pneumophila*[J]. Microbes and Infection, 1999, 1(14): 1203-1209.
- [11] Wright EK, Goodart SA, Growney JD, et al. Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*[J]. Current Biology, 2003, 13(1): 27-36.
- [12] O'Connell WA, Hickey EK, Cianciotto NP. A *Legionella pneumophila* gene that promotes hemin binding[J]. Infection and Immunity, 1996, 64(3): 842-848.
- [13] Conza L, Casati S, Gaia V. Detection limits of *Legionella pneumophila* in environmental samples after co-culture with *Acanthamoeba polyphaga*[J]. BMC Microbiology, 2013, 13(1): 1-6.
- [14] Cooper IR, Hanlon GW. Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection[J]. Journal of Hospital Infection, 2010, 74(2): 152-159.
- [15] Hurtado-Guerrero R, Zusman T, Pathak S, et al. Molecular mechanism of elongation factor 1A inhibition by a *Legionella pneumophila* glycosyltransferase[J]. The Biochemical Journal, 2010, 426(3): 281-292.
- [16] Lemaire S, Van Bambeke F, Tulkens PM. Cellular accumulation and pharmacodynamic evaluation of the intracellular activity of CEM-101, a novel fluoroketolide, against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Legionella pneumophila* in human THP-1 macrophages[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(9): 3734-3743.
- [17] 黄绍松, 徐润林, 陆勇军. 用绿色荧光蛋白研究军团菌与寄主的相互关系[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 21-24.
- [18] Micek ST, Kollef KE, Reichley RM, et al. Health care-associated pneumonia and community-acquired pneumonia: a single-center experience[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(10): 3568-3573.