论著

文章编号:1000-5404(2011)19-2000-04

肺炎链球菌 *dnaJ* 基因缺陷菌株的构建及毒力变化的初步研究

崔 瑾[1],张 群[2],董 杰[1],姜 慧[1],周爱娥[1],董姗姗[1],张雪梅[1],尹一兵[1],王 虹[1] (400016 重庆,重庆医科大学医学检验系[1];400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院检验科[2])

[摘要] **目的** 构建肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*,*S. pn*)*dnaJ* 基因缺陷菌株,并对其毒力作初步研究。**方法** 采用长臂同源多聚酶链式反应(long flanking homology polymerase chain reaction,LFH-PCR)技术将 *dnaJ* 基因替换为红霉素耐药基因(*erm*)后同源重组于肺炎链球菌,在含红霉素的血平板上筛选出 *dnaJ* 缺陷菌株。用 PCR 鉴定缺陷菌株,以细菌的吸光度值 *D*(600 nm)观察体外缺陷菌株生长情况。将 44 只 BALB/c 小鼠采用随机数字表法分为 2 组,分别用野生菌株和缺陷菌株处理,腹腔攻毒 100 μl 高(2×10^8 cfu)、低(2×10^6 cfu)剂量的菌液,各处理组的不同剂量组均有 11 只小鼠。记录小鼠死亡时间,计算存活率。60 只 BALB/c 小鼠采用随机数字表分为 2 组,分别鼻腔滴注含菌量为 2×10^7 cfu 的 30 μl D39 菌液和△*dnaJ* 菌液,感染后 6、12、24、36、48 h 处死每组中的 5 只小鼠,分别取鼻咽灌洗液、肺组织(匀浆)和心脏血培养,根据每组平均菌落计数结果绘制细菌在宿主体内的定植曲线。**结果** PCR 结果显示 *dnaJ* 基因完全被 *erm* 基因所替代,构建 *dnaJ* 缺陷菌成功;单个菌落培养基生长情况表明体外热休克状态抑制 *dnaJ* 缺陷菌生长;小鼠毒力实验显示腹腔感染缺陷菌株的小鼠存活率可达到 100%,而感染野生菌株的小鼠全部死亡,两者比较有统计学差异($P<0.01$)。小鼠鼻腔感染模型中,缺陷菌株在各时间点鼻咽灌洗液和肺部的细菌载量均显著低于野生菌株,而且入血后可在感染 24 h 内被宿主清除,上述差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 采用 LFH-PCR 技术作基因突变完全替代 *dnaJ* 基因,方法简便快捷;*dnaJ* 的缺陷影响细菌在体外应激条件下的生长,并显著降低细菌在宿主体内的毒力和定植。

[关键词] 肺炎链球菌;*dnaJ*;长臂同源多聚酶链式反应;毒力
[中图法分类号] R372; R378.12; R394-33 [文献标志码] A

Construction of *dnaJ*-defecient mutant strain of *Streptococcus pneumoniae* and preliminary study of its virulence

Cui Jin[1], Zhang Qun[2], Dong Jie[1], Jiang Hui[1], Zhou Aie[1], Dong Shanshan[1], Zhang Xuemei[1], Yin Yibing[1], Wang Hong[1] ([1]Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To lay a foundation for further exploration of host defense responses to DnaJ through the construction of *dnaJ*-defecient mutant strain of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn*) and the preliminary study of its virulence. **Methods** The *dnaJ* gene was replaced with an erythromycin resistance gene (*erm*) by long flanking homology polymerase chain reaction (LFH-PCR), and the recombinant fragment was transformed into *S. pn*. The *dnaJ*-defecient mutant strain of *S. pn* was screened out from the blood plates containing erythromycin and was verified by PCR. The growth of *dnaJ*-defecient mutant strain *in vitro* was observed based on its OD value (600 nm). Forty-four BALB/c mice were randomly divided into 2 groups, a wild-type strain group and a *dnaJ*-deficient mutant strain group. Each group was subdivided into a high dose (2×10^8 cfu) and a low dose (2×10^6 cfu) group (11 mice in each subgroup). The mice of the two groups were intraperitoneally given a high and a low dose of 100 μl D39 and △*dnaJ* bacteria liquid separately. The mice death time was recorded, and the survival rate was calculated. Sixty BALB/c mice were randomly divided into 2 groups, the mice of which were intranasally given D39 and △*dnaJ* bacteria liquid (30 μl, 2×10^7 cfu) separately. After 6 h, 12 h, 24 h, 36 h and 48 h infection, the mice were put to death (5 mice of each time point). The mice nasopharyngeal lavage fluid, lung tissue (homogenate) and heart blood were collected and cultured seperately. The colonization curve of the bacteria was drawn according to the average colony counting in each group. **Results** The PCR result showed that the *dnaJ* gene was completely replaced by the *erm* gene, and the *dnaJ*-deficient mutant strain was successfully constructed. The growth of the single colony in culture medium showed

[基金项目] 国家自然科学基金(81000766);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5397)
[通信作者] 王 虹,电话:(023)68485221,E-mail:wanghongljf@163.com

that the *dnaJ*-deficient bacteria growth was inhibited by heat shock *in vitro*. The virulence test suggested that the survival rate of mice with abdominal infection of the deficient strain was 100%, while that of mice with abdominal infection of wild-type strain was 0% ($P<0.01$). In the intranasal infection experiment, the loading amount of the deficient strain, which could be cleared in the blood within 24 h after infection, was significantly lower than that of the wild-type strain in the nasopharyngeal lavage fluid and lung tissue at each time point ($P<0.01$). **Conclusion** It is a convenient way to completely substitute for *dnaJ* gene using LFH-PCR. The *dnaJ* deficiency inhibits the growth of *dnaJ*-deficient bacteria under the heat shock *in vitro* and simultaneously reduces the bacterial virulence and colonization *in vivo*.

[**Key words**] *Streptococcus pneumoniae*; dnaJ; long flanking homology polymerase chain reaction; virulence

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81000766) and the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2009BB5397). Corresponding author: Wang Hong, Tel: 86-23-68485221, E-mail: wanghongljf@163.com

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*)是一种常见的革兰阳性条件致病菌,常定居于人上呼吸道而不引起症状,但在婴幼儿、老年人、免疫缺陷个体中可引起局部呼吸道感染(如中耳炎、鼻窦炎和支气管炎)。重要的是,肺炎链球菌具有明显的侵袭力,是造成细菌性肺炎和脑膜炎的主要病因。

细菌由外界环境进入宿主体内后会面临生存条件的改变,它们会应激性地调整基因表达以适应环境的选择压力。细菌的热休克蛋白正是在感染后的应激过程中产生的一组对细菌本身具有保护作用的相关蛋白,因此热休克蛋白的诱导合成对于致病菌在宿主体内存活非常关键[1]。*S. pn* 的 DnaJ 属于 Hsp40 家族,由 372 个氨基酸组成,相对分子量为 40×10^3,是一次跨膜的表面暴露蛋白,其功能主要是作为 DnaK(HSP70)的共分子伴侣,刺激 DnaK 的 ATPase 活性[2]。已知 *S. pn* 的许多表面暴露的蛋白与其致病性相关[3],而小鼠接种 *S. pn* 热休克蛋白 DnaJ 后可产生细胞和体液免疫反应,抵御致死量的肺炎链球菌的感染,即诱导保护性免疫反应[4];弧菌的 DnaJ 样蛋白对其感染的宿主血细胞有细胞毒作用[5],军团菌在宿主细胞内的生长需要 DnaJ 样蛋白[6]。因此,我们认为 DnaJ 在肺炎链球菌的致病过程中发挥重要作用。

本研究拟利用基于长臂同源多聚酶链反应(long flanking homology polymerase chain reaction, LFH-PCR)的方法[7],构建 *dnaJ* 基因缺陷菌株,研究该基因缺陷后细菌的体外生长及其在小鼠体内感染模型中毒力的变化,为后续进行宿主对肺炎链球菌 dnaJ 的免疫应答研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 BALB/c 小鼠 110 只,体质量 18~22 g,购于重庆医科大学实验动物中心,SPF 级,实验动物使用许可证号为 SYXK(渝)2007-0001。

1.2 细菌菌株及其他试剂

S. pn D39 菌株购于美国典型菌种保藏中心(American typical culture collection, ATCC)。培养基:C+Y 半合成培养基,哥伦比亚血平板。*S. pn* 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。DNA 提取试剂盒(TIANGEN 公司);胶回收试剂盒(invitrogen 公司);引物合成及测序由金思特科技(南京)有限公司合成。

1.3 连接片段的制备

以肺炎链球菌 D39 的基因组 DNA 为模板,首先用 PCR 分别扩增出 *dnaJ* 的上游片段 *dnaJ-up*(P1, P2),下游片段 *dnaJ-dw*(P3, P4)和 CMP8 的 *erm* 基因,引物 P2, P3 分别带有 22 和 23 个与 *erm* 基因 5′、3′端两侧互补的碱基,扩增出的上、下游片段分别带有一段与 *erm* 基因互补的序列;胶回收 3 个片段并定量;然后通过 PCR 用外侧引物(P1, P4)将这 3 个片段连接。胶回收连接片段,测序正确后转化。

1.4 肺炎链球菌实验室转化

取 -80 ℃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 $CaCl_2$ 和 2 g/L 的 BSA)中,当细菌达到一定菌密度时[$D(550)=0.08\sim0.10$],加入 CSP,37℃孵育 10 min,加连接片段,混匀,冰上放 30 min,37 ℃孵育 90 min,然后铺于含红霉素(0.25 mg/L)的血平板上,37 ℃孵育培养 24~48 h,挑取平板上的转化菌落,于含红霉素(0.25 mg/L)的 C+Y 中增菌,保存并提取 DNA。

1.5 缺陷菌株的 PCR 鉴定

分别以 D39、*dnaJ* 缺陷菌株(D39△*dnaJ*)的染色体 DNA 为模板,用 *dnaJ*、*erm* 的引物扩增 *dnaJ*(1 119 bp)基因和 *erm*(780 bp)基因;用 P1、P4 扩增 *up-erm-dw*(2 001 bp)片段。

1.6 细菌的体外生长情况

分别挑取 D39、△*dnaJ* 的单个菌落接种于 C+Y 培养基中,37 ℃培养 12 h,转接于 30 ml C+Y 培养基中,分别于 30 ℃、37 ℃、40 ℃培养。定时测定细菌的吸光度值 D(600 nm),以吸光度为纵坐标,时间为横坐标绘制细菌的生长曲线。

1.7 小鼠毒力实验

将 D39、△*dnaJ* 分别在 C+Y 培养基中培养到其 $D(600)=0.5$(菌密度约 1.5×10^8 cfu/ml)。44 只 BALB/c 小鼠采用随机数字表分为 2 组即 D39 和△dnaJ 处理组,腹腔攻毒 100 μl

高(2×10^8 cfu)、低(2×10^6 cfu)剂量的菌液,各处理组的不同剂量组均有11只小鼠。记录小鼠死亡时间,计算存活率。

1.8 小鼠定植实验

将D39、△*dnaJ*分别在C+Y培养基中培养到其$D(600)=0.5$(菌密度约1.5×10^8 cfu/ml)。60只BALB/c小鼠采用随机数字表分为2组,每组30只,分别鼻腔滴注30 μl D39菌液和△*dnaJ*菌液,含菌量为2×10^7 cfu,在感染后的6、12、24、36、48 h处死每组中的各5只小鼠,分别取鼻咽灌洗液、肺组织(匀浆)和心脏血,各标本作系列倍比稀释后取100 μl铺板计数。37 ℃培养24~48 h,根据每组中5只小鼠的平均菌落计数结果,分别以每毫升鼻咽灌洗液、每毫克肺组织和每毫升血液中所含菌量的对数为纵坐标,时间为横坐标绘制细菌在宿主体内的定植曲线。

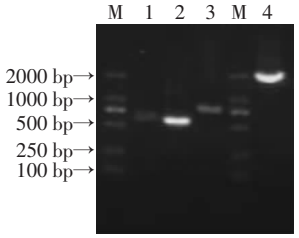
1.9 统计学方法

小鼠毒力实验和小鼠定植实验采用非配对*t*检验;以Graphpad统计软件prism 5.01版本进行分析。

2 结果

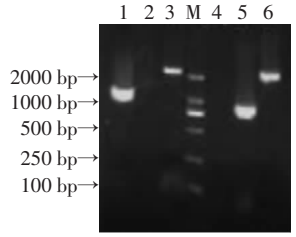
2.1 成功构建*S. pn dnaJ*基因缺陷菌株

分别以D39、CMP8的DNA为模板,用PCR扩增出了*dnaJ-up*(630 bp)、*dnaJ-dw*(591 bp)和*erm*(780 bp)3个片段(图1)。LFH-PCR连接3个片段,得到*up-erm-dw*(2 001 bp)重组片段(图1),测序结果显示3个片段连接正确。利用同源重组,将连接片段转化入D39野生菌株,红霉素血平板筛选出*dnaJ*缺陷菌株。△*dnaJ*缺陷菌株的PCR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*dnaJ*基因,因此野生菌株在1 119 bp处可见*dnaJ*片段,780 bp处无*erm*片段,而缺陷菌株在1 119 bp处无*dnaJ*片段,在780 bp处可见目的片段。用P1、P4扩增野生菌株和缺陷菌株,分别在约2 340 bp和2 001 bp处可见目的片段(图2)。



M:标准;1,*dnaJ-up*片段(630 bp);2:*dnaJ-dw*片段(591 bp);3:*erm*(780 bp)4:*up-erm-dw*重组片段(2 001 bp)

图1 PCR扩增*dnaJ-up*,*dnaJ*-dw及重组片段的电泳结果

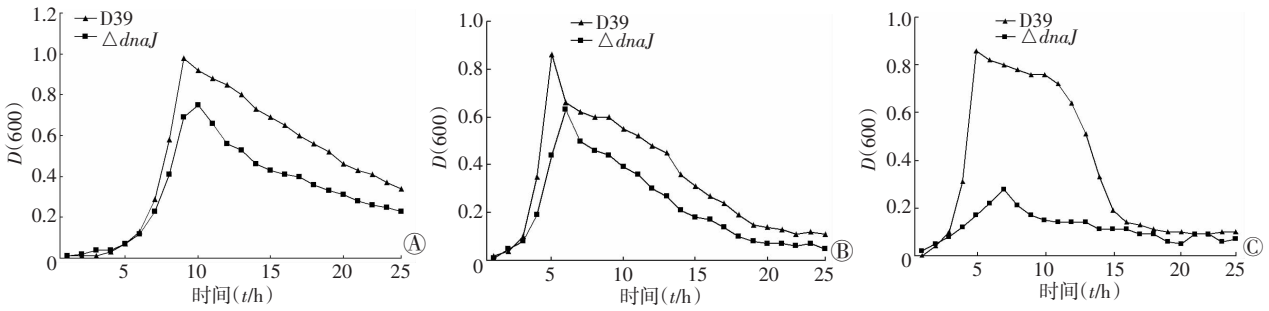


M:标准;1、2、3:以野生菌DNA为模板分别扩*dnaJ*(1 119 bp),*erm*(780 bp),*up-dnaJ-dw*(2 340 bp);4、5、6:以*dnaJ*缺陷菌DNA为模板分别扩*dnaJ*(1 119 bp),*erm*(780 bp),*up-erm-dw*(2 001 bp)

图2 *dnaJ*缺陷菌株的PCR鉴定结果

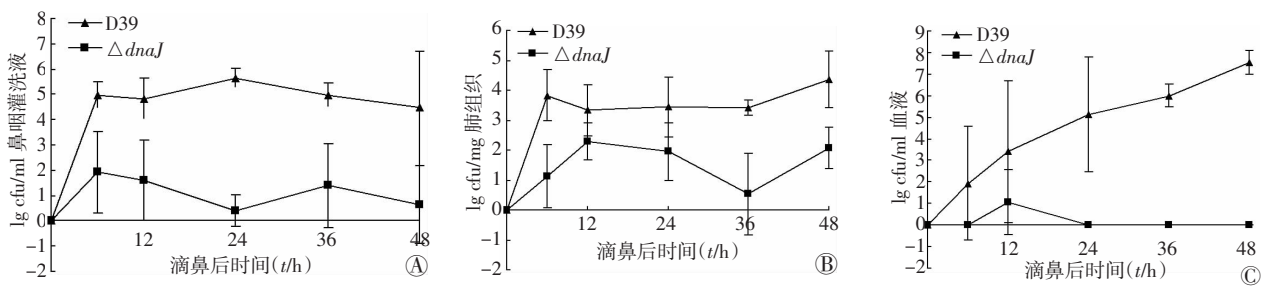
2.2 D39和△*dnaJ*的体外生长情况

野生菌和缺陷菌革兰染色油镜观察形态无明显区别,但在血平板上培养明显可见缺陷菌菌落变小。从生长曲线可以看出在液体培养基中,30、37 ℃培养时缺陷株和野生株的生长趋势大体一致(图3),但是40 ℃培养时缺陷株生长明显受抑制,表明*dnaJ*基因缺陷后在体外可抑制细菌在热应激情况下的生长(图3)。



A:30 ℃;B:37 ℃;C:40 ℃; a:$P>0.05$, b:$P<0.05$, c:$P<0.01$, 与D39组比较

图3 D39和△*dnaJ*在不同温度下的生长曲线



A:鼻咽灌洗液;B:肺组织;C:血液;a:$P>0.05$, b:$P<0.05$, c:$P<0.01$, 与D39组比较

图4 肺炎链球菌缺陷菌株(△*dnaJ*)和野生菌株(D39)定植小鼠鼻腔后鼻咽灌洗液、肺组织、血液中细菌载量比较

2.3 小鼠腹腔感染的毒力实验

感染野生菌株的小鼠组,高剂量组24 h全部死亡,低剂量组24 h死亡10只,剩余1只48 h死亡;而感染缺陷菌株的小鼠组高、低剂量组均活过21 d。野生菌株组存活率为0%,而缺陷菌株组存活率为100%,两者毒力具有统计学差异($P<0.01$)。

2.4 小鼠鼻腔感染的定植实验

缺陷菌株在各时间点鼻咽灌洗液、肺和血液的细菌载量均显著低于野生菌株,而且入血后可在感染24 h内被宿主清除,上述差异有统计学意义(图4)。

3 讨论

替代失活是构建两侧为目的基因同源序列,中间为耐药基因的断裂片段,转化宿主菌,通过同源重组使目的基因完全被耐药基因替代掉。采用PCR的方法制备断裂基因片段无需连接酶和质粒载体,只需要两步PCR获得相应基因的断裂片段和一步转化实验,快捷、方便。我们利用LFH-PCR策略成功构建了*dnaJ*缺陷菌株,可为后续研究肺炎链球菌和宿主相互作用提供实验菌株。

不同温度下的生长曲线显示*dnaJ*对于肺炎链球菌的体外生长并不是完全必要的,尤其是在37 ℃以下,但是*dnaJ*缺陷菌在40 ℃的生长出现温度敏感表型。小鼠毒力实验结果证明*dnaJ*缺陷后肺炎链球菌完全失去了对小鼠的致病性,缺陷菌处理组小鼠能够抵抗缺陷菌感染,长期存活。定植实验结果也显示缺陷菌株组在感染宿主后鼻咽灌洗液、肺和血液的细菌载量均显著低于野生菌株组。由于宿主防御反应可能伴随有体温的升高等,侵袭性细菌进入机体后,面对应激会上调自身的Hsps,使其表达量增大,从而更充分的抵御宿主免疫细胞的攻击[8]。我们推测*dnaJ*缺陷菌可能因其在高温下的敏感性不能在宿主体内大量繁殖,因此它在宿主体内菌量少,并对感染后的小鼠失去了毒力。

值得注意的是感染*dnaJ*缺陷菌的小鼠能在12 h之内将入血的缺陷菌清除,且小鼠外周血白细胞变化不大;而感染野生菌株的小鼠不但不能清除入血的细菌,而且随感染时间的延长细菌加速繁殖,进入重症感染并伴白细胞的急剧下降,最终导致感染小鼠的死亡。众所周知,细菌突破皮肤和黏膜屏障后可进入血流扩散,在短时间内到达各组织器官,引起严重的全身性感染,而我们的研究提示*dnaJ*缺陷菌入血后则不会出现严重的败血症。早期有研究自身免疫病中调节性T细胞可识别DnaJ蛋白的表位,刺激抗炎性细胞因子IL-10的分泌[9],而且DnaJ蛋白是肺炎链球菌的一种表面暴露蛋白,故我们认为*dnaJ*的缺陷除了引起细菌本身毒力的下降,还可能导致宿主对细菌防御机制的改变,有待进一步深入研究。

综上所述,*dnaJ*的缺陷在高温条件下明显抑制肺炎链球菌的体外生长,而在生理温度下不会产生影响;并且可显著降低细菌在宿主体内的毒力和定植能力。我们的前期研究证实*dnaJ*不仅在肺炎链球菌不同的血清型中具有高度的保守性,且dnaJ蛋白作为疫苗具有显著的免疫保护效果[10]。所以本研究的研究结果将为进一步阐明宿主对DnaJ蛋白的免疫应答,及以DnaJ为靶点的疫苗和抗菌药物开发提供一定的研究基础。

参考文献:

[1] Zugel U, Kaufmann S H. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases[J]. Clin Microbiol Rev, 1999, 12(1): 19-39.

[2] Chang L, Thompson AD, Ung P, *et al*. Mutagenesis reveals the complex relationships between ATPase rate and the chaperone activities of Escherichia coli heat shock protein 70 (HSP70/DnaK)[J]. J Biol Chem, 2010, 285(28): 21282-21291.

[3] Kadioglu A, Weiser J N, Paton J C, *et al*. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(4): 288-301.

[4] Khan M N, Bansal A, Shukla D, *et al*. Immunogenicity and protective efficacy of DnaJ (hsp40) of Streptococcus pneumoniae against lethal infection in mice[J]. Vaccine, 2006, 24(37/39): 6225-6231.

[5] Lakhal F, Bury-Mone S, Nomane Y, *et al*. DjlA, a membrane-anchored DnaJ-like protein, is required for cytotoxicity of clam pathogen Vibrio tapetis to hemocytes[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(18): 5750-5758.

[6] Ohnishi H, Mizunoe Y, Takade A, *et al*. Legionella dumoffii DjlA, a member of the DnaJ family, is required for intracellular growth[J]. Infect Immun, 2004, 72(6): 3592-3603.

[7] 张群, 胥文春, 尹一兵, 等. clpP基因缺陷对肺炎链球菌毒力表达降低的研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(4): 307-310.

[8] van-Eden W, van-der-Zee R, Prakken B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(4): 318-330.

[9] Massa M, Passalia M, Manzoni S M, *et al*. Differential recognition of heat-shock protein dnaJ-derived epitopes by effector and Treg cells leads to modulation of inflammation in juvenile idiopathic arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(5): 1648-1657.

[10] Cui Y, Zhang X, Gong Y, *et al*. Immunization with DnaJ (hsp40) could elicit protection against nasopharyngeal colonization and invasive infection caused by different strains of Streptococcus pneumoniae[J]. Vaccine, 2011, 29(9): 1736-1744.

(**收稿**:2011-04-08;**修回**:2011-06-03)

(编辑 邓强庭)