DOI:10.16016/j.2097-0927.202204009

# 荧光标记类鼻疽菌的构建及其与宿主细胞相互作用的应用研究

陈建高,饶承龙,刘文正,吴 潘,王旭冉,南栋琪,杨文波,毛旭虎 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系临床微生物与免疫学教研室

[摘要] **目的** 构建类鼻疽菌(*Burkholderia pseudomallei*, *B. pseudomallei*)的荧光示踪载体,获得自发荧光的类鼻疽菌株,并对其与宿主相互作用的感染过程进行初步应用研究。**方法** 采用基因重组技术,将绿色、红色和蓝色荧光蛋白(green/red/blue fluorescent protein, GFP/RFP/BFP)基因分别重组到原核表达载体 pUCP28T 上,构建类鼻疽菌组成型荧光表达载体,并通过体外细菌培养观察外源性荧光蛋白的表达对细菌生长能力的影响,以及荧光标记细菌遗传稳定性的检测。通过炎症因子 IL-8 的检测评价荧光标记细菌对宿主细胞感染能力的变化。利用活细胞工作站观察类鼻疽菌被宿主细胞自噬体包裹的动态过程。**结果** 构建了三种荧光标记的类鼻疽菌示踪载体,并且能在体外传代 20 代内稳定表达,且外源性荧光蛋白的表达不影响类鼻疽菌的生长和对宿主细胞的感染。同时,利用高分辨率活细胞成像系统观察到红色荧光标记的类鼻疽菌与宿主细胞 GFP-LC3 共定位的动态变化过程。**结论** 本文成功构建了三种荧光标记的类鼻疽菌,以期为类鼻疽菌致病机制的研究、抗菌药物的筛选提供重要实用工具。

[关键词] 类鼻疽菌;基因重组;荧光标记;自噬

[中图法分类号] Q935; R-331; R378.99 [文献标志码] A

# Construction of fluorescence-labeled *Burkholderia pseudomallei* and its interaction with host cells

CHEN Jiangao, RAO Chenglong, LIU Wenzheng, WU Pan, WANG Xuran, NAN Dongqi, YANG Wenbo, MAO Xuhu

Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy and Medical Laboratory, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To construct the fluorescence-labeled *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) to study the pathogenesis of the interaction between the bacteria and host cells. **Methods** Gene recombination technique was carried out to recombine the green fluorescent protein (GFP), red fluorescent protein (RFP) and blue fluorescent protein (BFP) genes into the prokaryotic expression vector pUCP28T, respectively, in order to obtain the fluorescence-labeled *B. pseudomallei*. Furthermore, the biological characteristics of fluorescence-labeled bacteria were detected in bacterial culture *in vitro*, and inflammatory factor IL-8 was detected to evaluate the changes in the ability of fluorescence-labeled bacteria infecting host cells. Then, the dynamic process of fluorescent-labeled *B. pseudomallei* being enveloped by host cell autophagosome was observed with aid of living cell workstation. **Results** Three fluorescence-labeled *B. pseudomallei* were constructed respectively, and were stably expressed in 20 passages *in vitro*. The expression of exogenous fluorescent proteins did not affect the growth of *B. pseudomallei* and infection of host cells. Meanwhile, the dynamic changes of co-localization between RFP-labeled *B. pseudomallei* and GFP-LC3 were observed by live cell imaging system. **Conclusion** Three different fluorescence-labeled *B. pseudomallei* are successfully constructed. And they are important practical tools for the pathogenesis of the bacteria and the screening of antimicrobial agents of melioidosis.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82272350);陆军军医大学科技创新能力提升专项(2021XJS07)

[通信作者] 毛旭虎,E-mail:maoxh2012@hotmail.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; gene recombination; fluorescence labeling; autophagy

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82272350) and the Technological Innovation Capability Improvement Project of Army Medical University (2021XJS07). Corresponding author: MAO Xuhu, E-mail: maoxh2012@hotmail.com

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*, *B. pseudomallei*)简称类鼻疽菌,是一种能引起人畜共患类鼻疽病的革兰阴性短杆菌,兼具B类生物威胁因子和Ⅰ类生物恐怖战剂的特性,严重威胁人类的健康和公共卫生安全[1-2]。类鼻疽主要流行于热带及亚热带地区,包括我国海南、广东、福建、香港、台湾等省市。随着全球气候的变化、交通的便利、经贸文化交流的频繁,其人群感染发生率逐年增高,可预见我国出现类鼻疽疫情的危险性将越来越高[3-4]。加强类鼻疽菌感染致病机制的研究,对其有效防控具有重要的理论指导意义。

病原菌与宿主的相互作用是感染和致病的前提。为了深入研究类鼻疽菌在感染免疫过程中细菌与宿主的相互作用,前期课题组建立了如DAPI直接染色、类鼻疽菌特异性抗体免疫荧光染色等研究手段,但其存在分辨率不高、操作繁琐、不能活体观察等缺点。因此,建立一种活菌荧光示踪的方法,有利于在细胞、组织或动物模型中持续动态地观察该菌的感染与致病过程。目前国内尚无荧光标记类鼻疽菌构建的报道,本文以类鼻疽菌常用的广泛宿主pUCP28T载体为骨架质粒,以常用的绿色、红色和蓝色荧光蛋白(green/red/blue fluorescent protein,GFP/RFP/BFP)为标记物,通过DNA重组技术将上述荧光基因分别克隆到载体pUCP28T上,以电转的方式导入重组质粒,构建多种荧光标记的类鼻疽菌,用于类鼻疽菌在细胞、动物体内的分布、定殖和存活情况以及其致病机制的研究方面。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞 类鼻疽菌BPC006菌株由本室分离鉴定并保存[5],大肠杆菌DH5α由本室保存。pUCP28T-16 S质粒由本室构建并保存,GFP-RFP-LC3质粒由日本大阪大学Tamotsu Yoshimori教授惠赠,pUCP24T-BFP质粒由陆军军医大学顾江教授惠赠。稳定表达GFP-LC3的小鼠巨噬细胞RAW264.7购于汉恒生物科技(上海)有限公司。

1.1.2 试剂及仪器 限制性内切酶*Xba*Ⅰ、*Hind*Ⅲ、*Spe*Ⅰ和高保真酶PrimeSTAR® HS DNA Polymerase、T4 DNA连接酶、DL-2000 marker、DL-10000 marker等均购自宝日医生物技术(北京)有限公司,质粒小提试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒等均购自天根生化科技(北京)有限公司,IL-8细胞因子检测试剂盒购于达科为生物技术有限公司。4%多聚甲醛和抗荧光猝灭封片剂购自上海碧云天生物技术有限公司,共聚焦皿购自NEST公司。

AppliedBiosystems PCR仪,美国ABI公司;微生物电穿孔仪MicroPulser,0.2 cm电击杯,酶标仪,凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司;动态活细胞成像及数据分析系统DeltaVision,美国GE公司;多功能智能成像系统iBright™ CL1500,美国Thermo公司;水平电泳槽,HE-90型电泳仪,上海天能科技有限公司;荧光显微镜CELENA® S,韩国Logos biosystemes公司。

1.1.3 细菌和细胞培养 类鼻疽菌BPC006和大肠杆菌DH5α均在LB培养基中,于37 ℃,200 rmp振荡培养。RAW264.7和A549细胞均培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于37 ℃、5% $CO_2$的培养箱中培养。甲氧苄啶使用浓度250 μg/mL。所有涉及类鼻疽菌的实验操作在生物安全P2+实验室进行,并严格按照实验室生物安全规范操作。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据GFP-RFP-LC3质粒的*gfp*和*rfp*基因序列设计引物GFP-F/R和RFP-F/R,并在GFP-F/R引物5'端分别插入*Xba*Ⅰ和*Hind*Ⅲ酶位点,在RFP-F/R引物5'端分别插入*Xba*Ⅰ和*Spe*Ⅰ酶位点;同理根据pUCP24T-BFP质粒的*bfp*基因设计引物BFP-F/R,并在上下游引物5'端插入*Xba*Ⅰ和*Hind*Ⅲ酶位点。引物均由华大基因科技有限公司合成。本实验所用引物序列详见表1。

1.2.2 绿色/蓝色/红色荧光蛋白(*gfp/bfp/rfp*)基因的扩增 以质粒GFP-RFP-LC3为模板,分别以GFP-F/R和RFP-R/F为上下游引物进行PCR扩增获得*gfp/bfp*基因片段。PCR反应体系(50 μL):2× Prime STAR® GC Buffer 25 μL,dNTP Mixture 4 μL,上下游引物(10 μmol/L)各1 μL,模板DNA 1 μL,Prime STAR® HS DNA Polymerase (2.5 U/μL) 0.5 μL,DMSO 2 μL,$ddH_2O$ 16.5 μL。PCR反应条件:95 ℃预变性5 min;98 ℃变性10 s,58 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,共35个循环;72 ℃延伸1.5 min。同理,以质粒pUCP24T-BFP为模板,以BFP-F/R为上下游引物PCR扩增获得*bfp*基因片段。将PCR扩增的*gfp/bfp/rfp*基因用1%的琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,具体实验步骤参照琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(DP209)说明。

1.2.3 含荧光基因(*gfp/rfp/bfp*)重组表达质粒pUCP28T-*gfp/rfp/bfp*的构建 将胶回收的*gfp/bfp*基因和pUCP28T质粒经*Xba* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切后,用T4 DNA连接酶于16 ℃过夜连接,连接产物热击转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,然后涂布于含250 μg/mL甲氧苄啶的LB平板进行筛选,挑取阳性单克隆菌落,于250 μg/mL甲氧苄啶的LB液体培养基振荡培养,取少量菌液送华大基因科技有限公司测序验证,其余菌液离心后提质粒,用*Xba* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切鉴定。由于*rfp*基因上存在两个*Hind* Ⅲ酶切位点,故需将构建成功的pUCP28T-BFP质粒和*rfp*基因经*Xba* Ⅰ和*Spe* Ⅰ双酶切后连接,同上,获得pUCP28T-RFP质粒,后续用*Xba* Ⅰ和*Spe* Ⅰ双酶切验证。

1.2.4 类鼻疽菌BPC006电转感受态的制备 从LB固体平板挑BPC006单菌落于5 mL SOB培养基震荡过夜,再按1∶10比例将过夜培养菌液接种到新鲜SOB培养基中,扩大培养到*D*(600)为0.6~0.8。将菌液置于冰上放置20 min,再于4 ℃,2 000 g,离心10 min,取50 mL预冷的无菌$ddH_2O$洗涤一遍后离心,菌沉淀再用25 mL预冷的10%无菌甘油洗涤2遍,离心沉淀收集菌体,加10%甘油500 μL重悬,每100 μL每管分装于-80 ℃暂存。

1.2.5 重组质粒电转化BPC006感受态细胞 将感受态细胞BPC006与重组质粒以10∶1体积于冰上混匀,加入到冰上预冷的0.2 cm电击杯中,冰上放置10 min。3 kV、200 Ω、25 μF电击后(时间常数为4.5~5 ms),立即加入1 mL 37 ℃预热的SOC培养基,转入1.5 mL离心管中,37 ℃振荡孵育2 h,取200 μL菌液涂布含250 μg/mL甲氧苄啶的LB平板,37 ℃孵箱培养36 h,挑单菌落重悬于适量的4%多聚甲醛中固定,取10 μL滴于载玻片,在荧光显微镜下观察,有荧光的菌落即为阳性克隆。

1.2.6 荧光菌株表达稳定性检测 将荧光类鼻疽菌BPC006接种于无抗性的LB培养基中,37 ℃培养,每隔16~18 h按0.1%的比例转接到新鲜的无抗LB培养基中,连续传代20次,取样适量稀释后,涂布于无抗LB平板(3个重复),置于孵箱37 ℃培养36 h,于多功能智能成像系统iBright™ CL1500下拍照观察荧光菌落,并计算荧光菌落数/总菌落数,即为荧光菌株的稳定表达率。

1.2.7 炎性因子IL-8的检测 将类鼻疽菌按感染复数(multiplicity of infection, MOI)10感染人肺上皮细胞A549,共孵2 h后加入250 μg/mL的卡那霉素,再孵育1 h后,置换新鲜的无抗完全DMEM培养基,分别在感染12、24 h收集感染细胞培养上清,并按说明书步骤检测IL-8含量。

1.2.8 活细胞成像系统观察类鼻疽菌与自噬标记分子LC3的实时动态变化 将稳定表达GFP-LC3的小鼠巨噬细胞RAW264.7以$1.5\times10^5$接种于激光共聚焦皿中,于细胞培养箱中(5% $CO_2$,37 ℃)过夜培养。选取红色荧光类鼻疽菌以MOI为10感染RAW264.7细胞,感染1.5 h后,用PBS清洗共聚焦皿3遍,然后加卡那霉素到250 μg/mL,孵育0.5 h后,PBS洗3遍,换无抗的完全DMEM培养基,于荧光显微镜上进行免疫荧光检测,并在高分辨率活细胞成像系统上动态观察类鼻疽菌与自噬标记分子LC3共聚的动态变化。

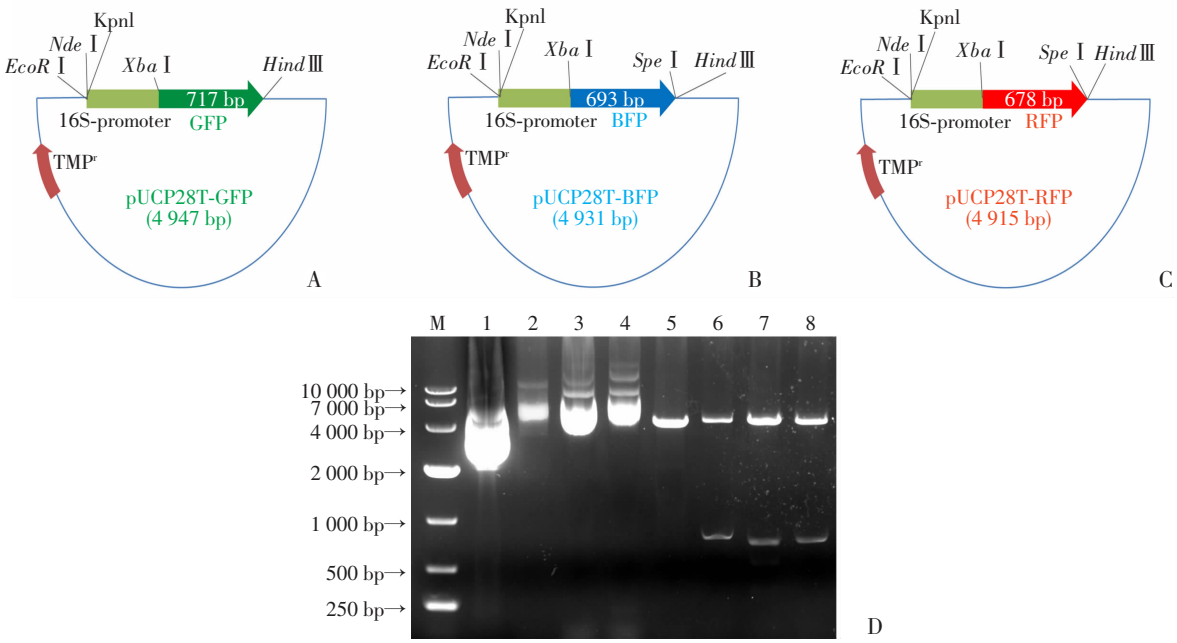
## 2 结果

### 2.1 荧光标记类鼻疽菌的构建

2.1.1 重组质粒的构建及鉴定 首先通过PCR扩增分别从模板上获得荧光基因*gfp/rfp/bfp*片段,经目的片段和载体双酶切后连于含有16 S启动子的表达载体pUCP28T上,构建重组表达荧光质粒(图1A~C)。具体地,*gfp/rfp/bfp*基因的PCR扩增片段经1%琼脂糖凝胶电泳后,在约750 bp处有1条特异的DNA条带,与GFP、RFP、BFP基因理论大小一致。接着,将连接成功的重组质粒转至大肠杆菌DH5α中进行复制扩增,菌液抽提质粒后,质粒pUCP28T-GFP和pUCP28T-BFP用*Xba* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切鉴定,质粒pUCP28T-RFP用*Xba* Ⅰ和*Spe* Ⅰ双酶切鉴定,均得出了与理论大小相符的酶切条带(图1D),并将重组质粒送至公司测序。测序结果显示插入片段正确,表明*gfp/rfp/bfp*基因均已成功克隆到类鼻疽菌表达载体pUCP28T质粒中。

**表1 荧光质粒的构建及鉴定引物**

| 基因片段 | 引物名称 | 引物序列(5′→3′) | 限制性核酸内切酶 | 片段大小 |
|---|---|---|---|---|
| *bfp* | BFP-F | GCTCTAGAATGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATG | *Xba* Ⅰ | 713 |
| | BFP-R | CCAAGCTTACTAGTTTAGTGCCCCAGTTTGCTAGGGAG | *Hind* Ⅲ、*Spe* Ⅰ | |
| *gfp* | GFP-F | TTTCTAGAATGATTAAAGGAGAAGAACTTTTCAC | *Xba* Ⅰ | 733 |
| | GFP-R | CCAAGCTTTTATTTGTAGAGCTCATCCATGCC | *Hind* Ⅲ | |
| *rfp* | RFP-F | GCTCTAGAATGGCGAGTAGCGAAGACG | *Xba* Ⅰ | 689 |
| | RFP-R | GGACTAGTTAAGCACCGGTGGAGTGACGAC | *Spe* Ⅰ | |




A、B、C 分别为荧光质粒 pUCP28T-GFP、pUCP28T-BFP、pUCP28T-RFP 构建示意图;D:荧光质粒酶切鉴定结果 M:DL-2000 标准;1:pUCP28T;2:pUCP28T-GFP;3:pUCP28T-RFP;4:pUCP28T-BFP;5~8 分别为 *Xba* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ或 *Spe* Ⅰ分别双酶切鉴定 pUCP28T、pUCP28T-GFP、pUCP28T-RFP、pUCP28T-BFP 载体

**图 1 重组质粒的构建和酶切鉴定结果**

2.1.2 荧光蛋白的表达 将构建成功的荧光重组质粒 pUCP28T-GFP、pUCP28T-RFP、pUCP28T-BFP 分别电转化到类鼻疽菌 BPC006 中,在含甲氧苄啶的 LB 平板上挑取生长菌落制片,在荧光显微镜下,通过发光表型筛选到了阳性克隆(图 2)。

2.2 荧光标记类鼻疽菌的生物学性质研究

2.2.1 细菌生长特性的检测 考虑到外源性 GFP、RFP、BFP 蛋白的表达对类鼻疽菌自身生长繁殖能力有无影响,我们通过体外培养未标记和荧光标记细菌,绘制生长曲线。如图所示,荧光标记细菌在体外培养条件下生长繁殖能力与未标记细菌无明显差异(图 3)。

2.2.2 感染细胞能力的变化 在前期研究的工作基础上,炎症因子 IL-8 的变化是评价类鼻疽菌感染 A549 细胞模型的重要检测指标。与对照组相比,未标记与标记菌株在感染 12 和 24 小时后均可以引起炎症因子 IL-8 的表达明显上调,且无明显差异,提示荧光标记类鼻疽菌感染宿主细胞的能力较未标记菌株无明显差异(图 4)。

2.2.3 遗传稳定性检测 将绿色和红色荧光标记的类鼻疽菌经连续稀释传代 20 次后,在无抗 LB 平板上仍能培养出带有荧光的菌落(图 5),且荧光菌落占总菌落数百分比为(92±5)%(绿色荧光菌)和(95±13)%(红色荧光菌),表明 GFP 和 RFP 标记的重组荧光类鼻疽菌在传代至 20 代时仍能稳定表达荧光蛋白。

2.3 荧光标记类鼻疽菌与宿主细胞互作的应用研究

通过活细胞成像系统实时动态观察荧光标记类鼻疽菌与宿主细胞自噬标记分子 LC3 共定位的变化。在类鼻疽菌感染 RAW264.7 巨噬细胞 2 h 的细胞模型中,通过荧光显微镜下观察,红色荧光标记的类鼻疽菌荧光明亮,能够与 RAW264.7 细胞中的 GFP-LC3 绿色荧光明显区分(图 6),结果提示后续无需再对类鼻疽菌进行荧光抗体标记,可用于直接观察类鼻疽菌与宿主细胞自噬相互作用的动态变化过程情况。

进一步,我们在高分辨率活细胞成像系统中实时动态观察类鼻疽菌侵入宿主细胞后,细胞自噬与类鼻疽菌互作的动态变化情况。如图 7 所示,同样的,如上所述,在类鼻疽菌感染 RAW264.7 细胞 2 h 后,我们在活细胞工作站中观察到随着类鼻疽菌侵入 RAW264.7 细胞后,自噬标志物 GFP-LC3 与红色荧光标记的类鼻疽菌发生共聚,并逐渐形成包裹类鼻疽菌的自噬小体,且整个过程在数分钟至数十分钟内即可完成。

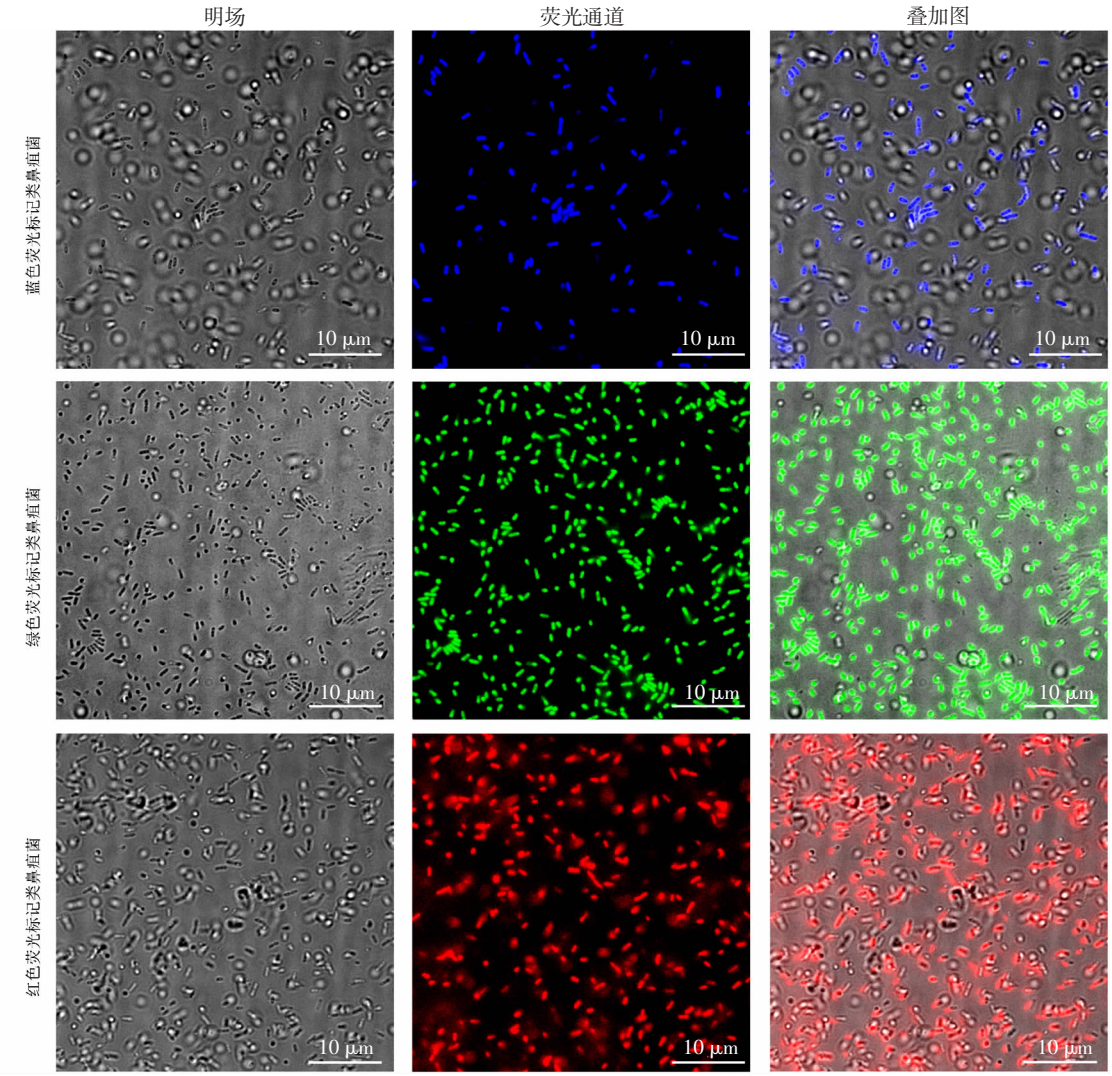
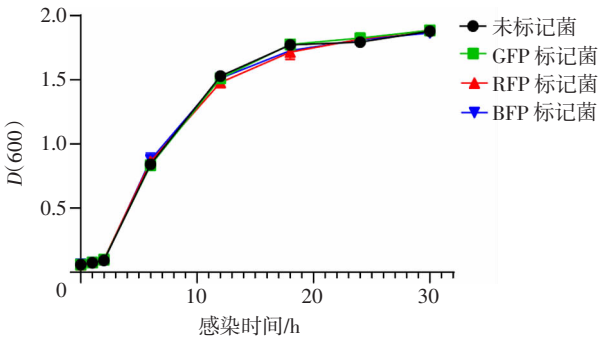
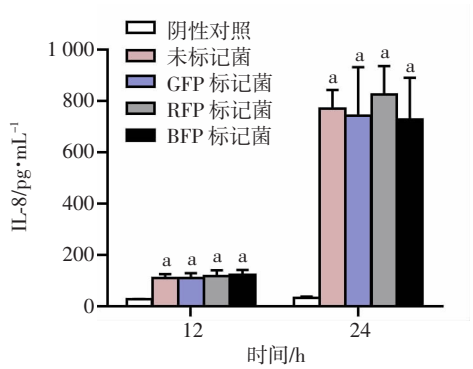



**图 2　荧光显微镜观察构建的荧光标记类鼻疽菌的荧光效果**




未标记菌:无荧光标记类鼻疽菌;GFP/RFP/BFP 分别表示绿色、红色、蓝色荧光标记的类鼻疽菌;将体外液体 LB 培养中的细菌进行 $D(600)$ 吸光度检测,绘制生长曲线

**图 3　未标记与荧光标记类鼻疽菌的生存曲线**　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)




阴性对照:未感染组;未标记菌:无荧光标记类鼻疽菌;GFP/RFP/BFP 分别表示绿色、红色、蓝色荧光标记的类鼻疽菌　a:$P<0.01$,与阴性对照比较

**图 4　未标记与荧光标记类鼻疽菌感染 A549 细胞后炎症因子 IL-8 的表达变化**　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

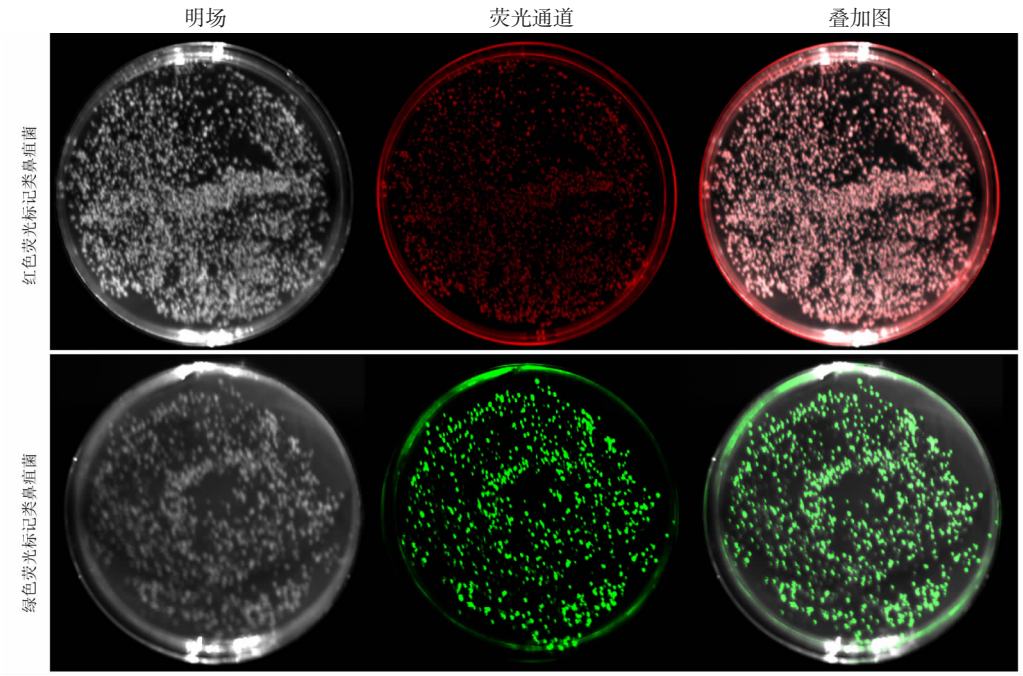



**图 5　GFP 和 RFP 标记类鼻疽菌传 20 代后的荧光菌落图**

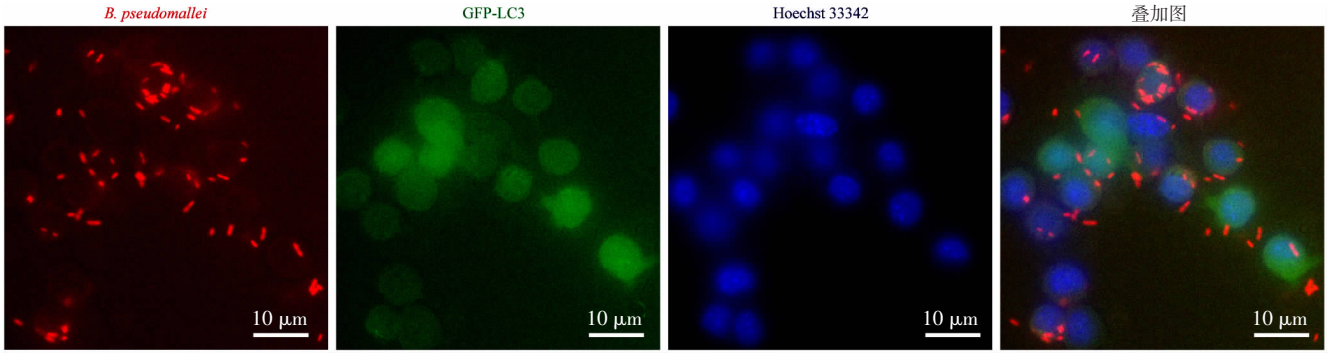



**图 6　荧光显微镜观察类鼻疽菌感染 RAW264.7 细胞后细菌和细胞的变化**

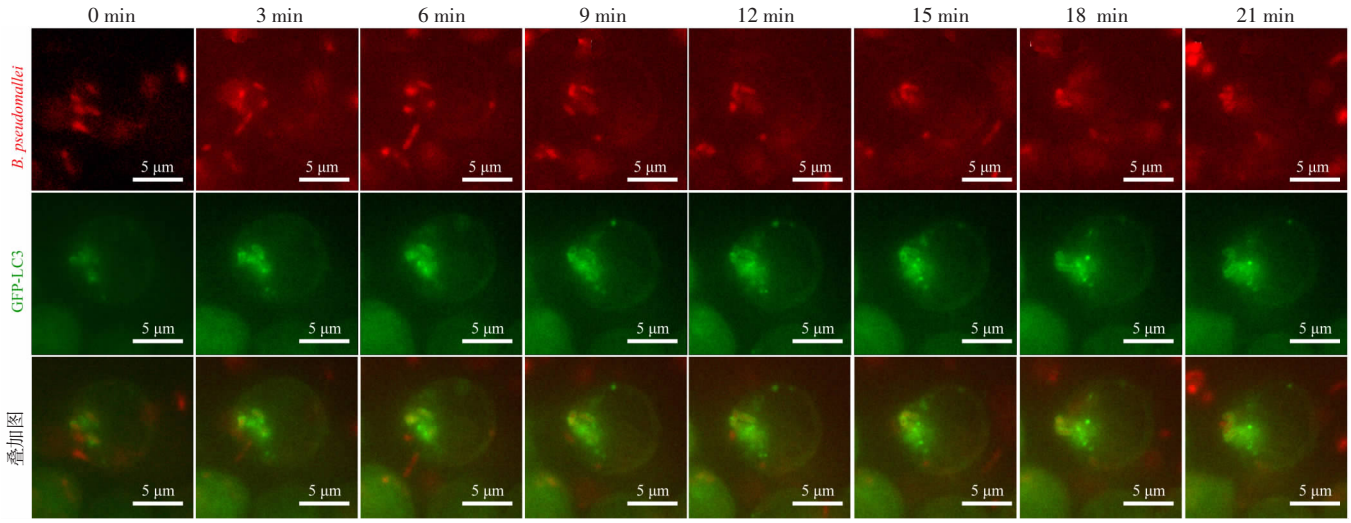



**图 7　高分辨率活细胞成像系统观察类鼻疽菌与 RAW264.7 细胞内 GFP-LC3 共定位的变化**

## 3 讨论

类鼻疽菌作为一种胞内感染病原菌,为了实现在宿主细胞内的生存、感染和致病,有效逃逸宿主细胞免疫清除是其成功定植和播散的前提。由于类鼻疽菌特殊的病原生物学特性,其防控还存在诸多困境,如天然耐药、临床症状不特异、缺乏快速准确的临床诊断技术、无疫苗使用等[1-2]。究其原因,根本问题在于类鼻疽菌的感染与免疫机制不明确,如在类鼻疽菌感染宿主的过程中,介导细菌免疫逃逸的重要致病因子有哪些、它们如何调控宿主免疫清除、细菌-宿主免疫互作的具体分子机制如何等问题尚未阐释清楚[6-8]。因此,深入研究类鼻疽菌与宿主互作及免疫逃逸,揭示该菌致病和传播分子机制,将为类鼻疽的防控奠定重要理论基础。

本课题组长期围绕类鼻疽菌逃逸宿主细胞免疫清除分子机制开展系统研究,前期工作中发现类鼻疽菌可通过阻碍宿主细胞吞噬囊泡转运成熟、诱导miRNAs靶向抑制自噬关键基因ATG10以及操纵NR1D2-ATGL调控轴干扰脂噬途径从而妨碍宿主细胞自噬清除等多种途径逃逸宿主细胞免疫清除作用,达到持续性感染的目的[9-10]。但是,研究多采用细胞爬片固定后免疫荧光染色,或者提取细胞内相关成分进行体外生化分析等,只能做到对某个时间点的记录,无法进行类鼻疽菌与宿主细胞互作的实时动态观察,这无疑对揭示类鼻疽菌感染免疫机制是一种研究手段的缺陷。构建荧光标记的类鼻疽菌活菌,将为实现直接、适时和动态观察细菌与宿主的互作提供有力的工具。目前荧光标记细菌技术已在结核分枝杆菌、军团嗜肺菌、沙门氏菌、志贺氏菌等病原体中广泛应用[11-13],常用的标记荧光包括绿色、红色、蓝色等。荧光蛋白作为细菌的标记物具有多种优势,以绿色荧光蛋白为例,GFP于1974年从水母Aequorea victoria中被发现,相对分子量为31kD,已被用作多种真核和原核生物体的荧光标志或者胞内报告蛋白[14-15]。比较于其他生物发光系统而言,GFP的优势体现在当受到蓝光或紫外光激发后发出明亮绿色荧光的过程中不需要其他辅助因子,而其独特性质的原因来自于它的激发中心由3个氨基酸残基($Ser^{65}Tyr^{66}Gly^{67}$)组成的环化自动催化生色团[16];然后,对靶细胞进行非侵入性处理后进行荧光检测,GFP的表达就能够在活细胞中被直接观察到;再者,GFP能够在单个细胞中被检测和定量,这不同于其他需要较多检测装备的标记示踪系统。因此,我们首先构建了GFP标记的类鼻疽菌,以期为课题组后续类鼻疽菌基础与应用研究提供重要的手段。同时,鉴于如果宿主细胞采用了相同的颜色标记,本文也采用同样的技术构建了RFP/BFP标记的类鼻疽菌,以满足不同实验条件下对不同颜色荧光标记的需求。

启动子对目的基因的表达至关重要。为了获得荧光蛋白在类鼻疽菌中的高效表达,本文在前期工作中构建了多种启动子序列,包括类鼻疽菌的功能基因的启动或者其他细菌的外源性启动子,但均不能有效启动下游荧光基因的表达甚至影响类鼻疽菌的存活,最后经过一系列的筛选,使用了类鼻疽菌的16 S rDNA启动子作为重组质粒表达的启动子,三种荧光蛋白才在类鼻疽菌中得到了理想表达,单个细菌在荧光显微镜下均呈现出不同颜色的明亮荧光。另外,我们改进了外源性质粒转入类鼻疽菌的方式,在以往的研究中均采用的是通过大肠杆菌SM10接合的方式导入,转化效率低且时间长[17-18];而本实验中改用了制备类鼻疽菌电转感受态并通过电转的方式将重组质粒导入类鼻疽菌,转化效率高且快速。我们还对荧光标记的类鼻疽菌进行了生长特性和遗传稳定性研究,结果表明,和野生型BPC006一样,构建的工程菌体外培养的生长曲线基本一致,感染宿主细胞的特性也无差异表现,体外无选择压力下,连续传代20代,细菌的荧光和质粒保有率超过90%,完全满足后续感染研究工作的需要。

自噬是宿主细胞通过自噬小体包裹胞内病原菌并经自噬-溶酶体途径对病原体进行免疫清除的一种方式,其中LC3即自噬相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein light chain 3),是自噬过程中重要且常用的标志蛋白[19-20]。我们利用RFP标记的类鼻疽菌和GFP-LC3标记的RAW264.7细胞的感染模型中观察了类鼻疽菌与宿主细胞相互作用过程中自噬的变化,荧光显微镜下可见红色的细菌和绿色的细胞都分外明亮,能够明显区分,可用于后续类鼻疽菌与宿主自噬等互作机制的相关研究。

本文构建的荧光蛋白稳定表达的标记菌株除了用于细菌与宿主细胞互作的研究,如动态监测类鼻疽菌如何侵入细胞以及侵入的时间、逃逸吞噬囊泡的过程、与感染宿主的胞质免疫、传播路径以及胞内增殖与宿主细胞的转归等以外,也可通过将荧光蛋白基因与类鼻疽菌的启动子进行融合,研究已知启动子的调节或者鉴定在特殊环境下启动子的活性,以及通过将荧光蛋白基因与类鼻疽菌重要致病因子基因进行融合,研

究该蛋白的定位和分泌方式等;另外,荧光标记的类鼻疽菌还可用于抗菌药物的筛选、抗菌活性的评价等,直观简便快速易行。

综上,本文构建了多种荧光标记的类鼻疽菌,该标记系统具有高度敏感性、非侵入性荧光检测、快速检测和定量以及在单个活菌中检测基因表达等优势。利用荧光标记菌株,将进一步帮助我们发现类鼻疽菌特殊的适应性机制,提高对其持续性感染机理的认识,快速高通量筛选抗菌药物,具有较大的应用价值。

**参考文献:**


[1] WIERSINGA W J, VIRK H S, TORRES A G, *et al*. Melioidosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 17107. DOI: 10.1038/nrdp.2017.107.

[2] Wiersinga WJ, Currie BJ, Peacock SJ: Melioidosis[J]. N Engl J Med 2012, 367(11): 1035-1044. DOI: 10.1056/NEJMra1204699.

[3] GASSIEP I, ARMSTRONG M, NORTON R. Human melioidosis[J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(2): e00006-e00019. DOI: 10.1128/CMR.00006-19.

[4] BIRNIE E, VIRK H S, SAVELKOEL J, *et al*. Global burden of melioidosis in 2015: a systematic review and data synthesis[J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19(8): 892-902. DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30157-4.

[5] FANG Y, HUANG Y, LI Q, *et al*. First genome sequence of a Burkholderia pseudomallei isolate in China, strain BPC006, obtained from a melioidosis patient in Hainan[J]. J Bacteriol, 2012, 194(23): 6604-6605. DOI: 10.1128/jb.01577-12.

[6] WILLCOCKS S J, DENMAN C C, ATKINS H S, *et al*. Intracellular replication of the well-armed pathogen Burkholderia pseudomallei[J]. Curr Opin Microbiol, 2016, 29: 94-103. DOI: 10.1016/j.mib.2015.11.007.

[7] ALLWOOD E M, DEVENISH R J, PRESCOTT M, *et al*. Strategies for intracellular survival of Burkholderia pseudomallei[J]. Front Microbiol, 2011, 2: 170. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00170.

[8] STONE J K, DESHAZER D, BRETT P J, *et al*. Melioidosis: molecular aspects of pathogenesis[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2014, 12(12): 1487-1499. DOI: 10.1586/14787210.2014.970634.

[9] TANG M L, HU Z Q, RAO C L, *et al*. Burkholderia pseudomallei interferes with host lipid metabolism via NR1D2-mediated PNPLA2/ATGL suppression to block autophagy-dependent inhibition of infection[J]. Autophagy, 2021, 17(8): 1918-1933. DOI: 10.1080/15548627.2020.1801270.

[10] HU Z Q, RAO C L, TANG M L, *et al*. Rab32 GTPase, as a direct target of miR-30b/c, controls the intracellular survival of Burkholderia pseudomallei by regulating phagosome maturation[J]. PLoS Pathog, 2019, 15(6): e1007879. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007879.

[11] HU Y L, WEN Z H, LIU S, *et al*. Ibrutinib suppresses intracellular Mycobacterium tuberculosis growth by inducing macrophage autophagy[J]. J Infect, 2020, 80(6): e19-e26. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.03.003.

[12] XU Y, ZHOU P, CHENG S, *et al*. A bacterial effector reveals the V-ATPase-ATG16L1 axis that initiates xenophagy[J]. Cell, 2019, 178(3): 552-566.e20. DOI: 10.1016/j.cell.2019.06.007.

[13] GLUECK N K, O'BRIEN K M, SEGUIN D C, *et al*. Legionella pneumophila LegC7 effector protein drives aberrant endoplasmic Reticulum: endosome contacts in yeast[J]. Traffic, 2021, 22(8): 284-302. DOI: 10.1111/tra.12807.

[14] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, *et al*. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263(5148): 802-805. DOI: 10.1126/science.8303295.

[15] JOSENHANS C, FRIEDRICH S, SUERBAUM S. Green fluorescent protein as a novel marker and reporter system in Helicobacter sp[J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 161(2): 263-273. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12957.x.

[16] CODY C W, PRASHER D C, WESTLER W M, *et al*. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein[J]. Biochemistry, 1993, 32(5): 1212-1218. DOI: 10.1021/bi00056a003.

[17] CHUA K L, CHAN Y Y, GAN Y H. Flagella are virulence determinants of Burkholderia pseudomallei[J]. Infect Immun, 2003, 71(4): 1622-1629. DOI: 10.1128/IAI.71.4.1622-1629.2003.

[18] WONG J, CHEN Y H, GAN Y H. Host cytosolic glutathione sensing by a membrane histidine kinase activates the type VI secretion system in an intracellular bacterium[J]. Cell Host Microbe, 2015, 18(1): 38-48. DOI: 10.1016/j.chom.2015.06.002.

[19] DERETIC V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism[J]. Immunity, 2021, 54(3): 437-453. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.01.018.

[20] DERETIC V, SAITOH T, AKIRA S. Autophagy in infection, inflammation and immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(10): 722-737. DOI: 10.1038/nri3532.


(**收稿**:2022-04-01;**修回**:2022-06-24)

(编辑 邓强庭)