基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1462-04

操纵子 comCDE 调控肺炎链球菌转化的分子机制研究

袁泰先,朱兴华,吴凯峰,尹楠林,胥文春,王 虹,尹一兵,张雪梅
(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)

【摘 要】目的:探讨操纵子 comCDE 对调控肺炎链球菌转化的分子机制。方法:将 D39 野生菌株与 comE 基因缺陷菌株(△comE)分别用感受态刺激因子(Competence-stimulating peptide,CSP)诱导转化,记录不同时间点的转化率,并采用 FQ -PCR 技术检测其 comE 的 mRNA 表达水平,并通过双向电泳及图像分析比较 CSP 诱导后不同时间点的蛋白质表达谱差异及野生菌株与△comE 菌株的蛋白质表达谱差异。结果:D39 菌株在 CSP 诱导后不同时间点都能发生转化,其中 0 min 时转化率最高,其 comE 的 mRNA 表达量在 CSP 诱导 10 min 后表达显著增加,20 min 时迅速回落($P<0.05$)。△comE 菌株不能被 CSP 诱导发生转化。蛋白质组学研究显示,△comE 菌株有 6 个蛋白较 D39 菌株的表达量显著增加;CSP 诱导 10 min 时有 6 个蛋白表达显著增加,而在 20 min 时又迅速回落;二者有 2 个蛋白相同;有 1 个蛋白在加入 CSP 后表达显著降低。结论:基因 comE 的存在是 CSP 诱导转化必需的,CSP 诱导转化可能有非 comE 依赖途径,而 comE 可能有除转化以外调控功能,且不依赖于 CSP。

【关键词】肺炎链球菌;转化;操纵子 comCDE;双向凝胶电泳
【中国图书分类法分类号】R378.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-22

Investigation on the molecular mechanism of operon comCDE regulating the transformation of Streptococcus pneumoniae

YUAN Tai-Xian, et al
(*Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the molecular mechanism of operon comCDE regulating S.pn transformation. *Methods*: The wild S. pn strains and their comE-defective derivations (△comE) were subjected to CSP-induced transformation. Transformation rates were calculated at different time points, and the mRNA expression levels of comE were detected by FQ PCR. The proteins of different expression among different strains were detected by two-dimensional electrophoresis and image analysis. *Results*: D39 could undergo transformation at 0、10 min and 20 min after CSP was added, and the transformation rate at 0min was the highest. After 10 minutes induction with CSP the mRNA level of comE was significantly higher than that of basal level($P<0.05$), and at 20minutes the mRNA level of comE was significantly decreased. For comE -defective strain, the transformation rate was 0. proteomics analysis displayed that six proteins were expressed significantly higher in △comE strains than that in D39 wild stains. The expression of six proteins increased significantly at 10 minutes after CSP was added, but reduced quickly at 20 minutes after CSP was added. The expression of two proteins were changed in both cases. The expression of another one protein was significantly decreased after CSP was added. *Conclusion*: ComE is an essential gene for CSP-induced transformation, CSP probably induces some transformation related genes by comE-independent pathway. And comE probably has other fuctions than regulated- transformation, and it might be CSP-independent.

【Key words】Streptococcus pneumoniae; Transformation; Operon comCDE; Two- dimensional electrophoresis

肺炎链球菌的转化受操纵子 comCDE 调控,其中 comC 的表达产物为感受态刺激因子(Competence-stimulating peptide,CSP),目前的研究显示肺炎链球菌的转化都是由 CSP 诱导产生的[1]。comDE 为一双组份系统,comD 蛋白为具有组氨酸激酶活性的膜受体,可感受 CSP 信号。comD 与 CSP 结合后自身磷酸化激活,磷酸化激活蛋白 comE,comE 被激活后具有转录因子的作用,可以启动包括自身操纵子在内的多基因表达,使细菌进入感受态,从而启动转化相关基因的表达使细菌发生转化[2]。然而至今我们仍不清楚蛋白 comE 激活后,下游到底启动

作者介绍:袁泰先(1964-),男,实验师,研究方向:分子生物学技术。
通讯作者:张雪梅,女,副教授,E-mail:apoe@163.com。
基金项目:国家自然科学基金(30371275);重庆市科委自然科学基金(CSTC,2007BB5270)。

了哪些基因表达发生或(和)关闭了哪些抑制转化发生的基因。

研究显示 comE 基因的表达存在非 CSP 依赖途径[3],因此本研究拟通过 CSP 诱导肺炎链球菌转化,比较其不同时间的转化率及基因 comE 的表达水平,观察 CSP 对 comE 表达的诱导效应;并通过双向凝胶电泳比较 comE 缺陷菌株与野生菌株的差异及 CSP 诱导细菌发生转化前后的差异,探寻转化发生时 CSP 诱导的蛋白是否与 comE 诱导的蛋白一致。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株 肺炎链球菌 D39 型菌株购于 NCTC;D39 的 comE 基因缺陷型菌株(△comE)由本课题组构建保存。

1.1.2 一般试剂 C+Y 半合成培养基,感受态刺激肽(CSP1):吉尔生化(上海)有限公司合成,纯度为 99.5%。

细菌 RNA 提取试剂盒购于 Omega 公司;胶回收试剂盒购于上海华舜公司;逆转录试剂盒、SYBR Green Ⅰ荧光定量 RT-PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司。

1.1.3 荧光定量 PCR 引物 由上海生工生物工程技术公司合成,序列见表 1。

1.1.4 蛋白质组学试剂 IPG 干胶条 (pH4~7,17 cm)、Bio-lyte、二硫苏糖醇(DTT)、丙基硫酸盐(CHAPS)、碘乙酰胺(Iodoacetamide)、硫脲(Thioourea)均购于美国 Bio-Rad 公司;十二烷基硫酸纳(SDS)、甘氨酸(Glycin)、超纯脲(Ultra urea)、四甲基乙二胺(TEMED)、蛋白酶抑制剂、三氟乙酸(TFA)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺均购于上海生工公司;低分子量蛋白标记物购于宝生物公司;变溶菌素购于美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 肺炎链球菌的 CSP 诱导转化 将肺炎链球菌培养于 CTM 培养基中至 A_{550}=0.1 左右,加入 CSP 使其终浓度为 100 μg/L。在 CSP 加入后 0、10、20 min 取 100 μl 菌液加入 4 μl(0.080 g/L)的外源 DNA(抗红霉素基因 erm),于 37℃水浴箱孵育 90 min,然后铺于含 0.25 mg/L 红霉素的 TSA 血平板上,于 37℃孵箱培养 24 ~ 48 h,计数平板上的转化菌落数,并转换成转化率。

转化率按下面公式计算(细菌总数按 A_{620}=0.6 时,细菌数为 5×10^8 cfu/ml 计算):

$$转化率=\frac{平板均落数}{细菌总数}\times100\%$$

结果分析采用 t 检验。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测基因的 mRNA 表达量 提取细菌 RNA,逆转录成 cDNA,以样品 cDNA 作为模板,进行荧光定量 PCR 检测目的基因 comE,将 16SrRNA 作为内参基因。将目的基因的质粒标准品倍比稀释为 10^8 ~ 10^2 copies/μl,做标准曲线。反应体系和条件均参照 TaKaRa SYBR Green Ⅰ RT-PCR 试剂盒。根据标准品浓度与 Ct 值的对应关系可绘制出标准曲线,然后根据样品 Ct 值可从标准曲线上求出各待测标本的初始浓度。以 16SrRNA 作内参基因,comE/16SrRNA 作为衡量 comE 基因转录水平的指标。

1.2.3 蛋白质组学技术分析诱导转化相关蛋白

1.2.3.1 双向电泳 将细菌接种于 200 ml C+Y 培养基中,增菌培养至 OD_{550}=0.09 ~ 0.10 时收集细菌。每 50 mg 标本加入 1 ml 蛋白质裂解缓冲液,冰上超声破碎 30 min(5 s/ 次)。加入 50 μg/ml RNase 及 200 μg/ml DNase,冰上放置 30 min。4℃,12 000 r/min 离心 30 min。收集上清液,定量后分装冻存于 -80℃备用。

1.2.3.2 第一向 固相 pH 梯度等电聚焦 将提取的蛋白样品(总蛋白含量为 160 μg)加入水化上样缓冲液中,总体积为 350 μl,用封口胶封口,振荡器混匀,并瞬时离心。沿聚焦盘边缘线性加入样品,室温平衡后,将胶条与电极紧密接触,放置 20 min 后,在胶条上覆盖 2 ml 矿物油,防止液体蒸发。盖上盖子,设置等电聚焦程序,按程序自动进行等点聚焦。

1.2.3.3 第二向 垂直平板 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 将等电聚焦后的 IPG 胶条在平衡缓冲液中平衡后,移至 10%的 SDS-PAGE 凝胶上方,加入分子量蛋白质标准后,接通电源,待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时即可停止电泳。

1.2.3.4 银染显色及图像分析 采用常规方法进行银染,染色后的凝胶用 Microtek 4850 Ⅱ 扫描仪扫描凝胶。利用 PDQuest 7.3 软件分析产生合成图,以其中的一张图谱作为标准凝胶图像,其它的图谱与之进行比较,从而构建一套配比。对来自不同批次的样品经 2-DE 分离后的蛋白斑点进行均化处理,以消除蛋白上样量不一致带来的误差。并根据 Normalised Volume 值的变化来判断蛋白斑点表达量的变化。

2 结 果

2.1 细菌在 CSP 诱导后不同时间的转化差异

分别将 D39 菌株和△comE 进行 CSP 诱导转化,结果显示野生菌株能够被 CSP 诱导发生转化,其在 0、10、20 min 的转化率见表 2,其中 0 min 时的转化率最高。△comE 菌株在各个时间点的转化筛选平板上都未见转化菌落,提示 CSP 不能诱导△comE 菌株发生转化。

2.2 D39 菌株在 CSP 诱导后不同时间的 comE 基因 mRNA 表达变化

在 CSP 诱导 D39 菌株转化时的 0、10、20 min 分别收集

表 1 各目的基因特异性引物序列

基因	引物序列	产物大小(bp)
comE	上游引物 5'-TCGTCATTACAATCCTTACGCTAT-3'	274
	下游引物 5'-ACCCCTGTTGTTTCAATATACAAA-3'	
16SrRNA	上游引物 5'-GTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGT-3'	245
	下游引物 5'-CTGTCCCGAAGGAAAACTCTATCT-3'	

菌液,提取 RNA,定量检测 comE 基因的mRNA 表达量,其结果如表 3,结果显示 CSP 诱导10 min 时 comE 的 mRNA 的表达量较 0 min 和 20 min 时显著增高($P<0.05$),即 comE 基因在 CSP 诱导后 10 min 时显著升高,而在 20 min 时又迅速降低,甚至低于初始水平。

2.3 D39 型肺炎链球菌双向凝胶电泳分析

2.3.1 D39 菌株与△comE 菌株的蛋白电泳图谱比较 从图 1 可以看出,细菌蛋白种类繁多,且多集中于 pI 4~7 和分子量 20.1~66.4 kD 范围内,D39 菌株与△comE 菌株的蛋白点大约分别为 156 个和 198 个。以 D39 菌株图谱为参考,根据 PDQuest7.3 软件分析结果,有 6 个点的蛋白表达有 3 倍差异,它们在△comE 菌株中表达增高,提示在野生型菌株中这几个蛋白的表达受到 comE 蛋白的抑制。

2.3.2 CSP 诱导 D39 菌株后不同时间蛋白电泳图谱比较 将细菌培养至 OD_{550}=0.09~0.10 时加入 CSP(终浓度为 100 μg/L)分别诱导 0、10、20 min,然后提蛋白做 2-DE 分析,得到的 2-DE 银染图谱如图 2。细菌在 CSP 诱导 0、10、20 min 的蛋白点大约分别为 156、212、145 个。以 0 min 图谱为参考,根据 PDQuest7.3 软件分析结果,有 7 个点的蛋白表达有 3 倍差异,其中 6 个蛋白(1~6 号蛋白)在 CSP 诱导 10 min 时表达增高,即为 CSP 诱导蛋白;1 个蛋白(7 号蛋白)则是 0 min 时较 10 min 时表达量高,提示其为 CSP 抑制蛋白。20 min 时的蛋白图谱与 0 min 时图谱比较,只有 7 号蛋白表达量有显著差异。

与 comE 蛋白差异图谱比较可见,其中 2 个蛋白位置一致(红色圈表示),即这 2 个蛋白表达受到 comE 蛋白的抑制,但却被 CSP 诱导表达增加。而被 CSP 抑制的蛋白(7 号蛋白)并未受到 comE 蛋白的抑制。

3 讨 论

操纵子 comCDE 是调控肺炎链球菌感受态的关键基因,各种环境因素对肺炎链球菌转化发生的调节都是通过直接或间接方式影响该操纵子的表达来实现的[4,5]。早期的研究显示 CSP 是通过激活 comE 蛋白后诱导操纵子 comCDE 自身表达增加,形成一个正反馈,并诱导其他相关基因表达,从而转化发生。本研究显示 CSP 加入野生菌后 comE 表达量显著增高,细菌转化发生,随后表达量迅速回落,细菌的转化率也随之降低;而△comE 菌株缺陷 comE 基因而不能发生转化,提示 CSP 诱导细菌转化的确需要基因 comE 的存在,且有 1 个诱导操纵子 comCDE 基因表达增高的过程,这一结果与许多同行的研究结果一致[6,7]。

根据这些研究结果,提示高水平的 comE 表达是转化发生所需要的,那么 CSP 诱导的下游转化相关基因应该与 comE 诱导转化基因一致。然而近期有研究显示 comE 的表达可在某些情况下独立于 CSP 的诱导,那么其中转化过程中是否也存在这种情况呢?因此本研究对细菌转化进行了蛋白质组学研究,结果显示在 CSP 诱导的野生菌株中显示有 6 个蛋白表达在 10min 时显著增加,而 20 min 时迅速回落,与细菌转化发生的规律一致,提示这几个蛋白应该是转化相关蛋白。对△comE 菌株和野生菌进行差异蛋白质组比较,结果显示有 6 个蛋白的表达显著高于野生菌株,提示在野生菌株中这 6 个蛋白是受到 comE 蛋白的抑制;而其中有 2 个蛋白正是前面结果显示的 comE 抑制蛋白,这一结果提示这 2 个转化相关蛋白的诱导表达可能不是通过 comE 蛋白,即 CSP 诱导转化相关基因表达可能还有除 comE 以外的其他途径。

本研究还发现第 7 号蛋白受到 CSP 的抑制,但该蛋白并未受到 comE 的抑制,提示 CSP 对该蛋白的抑制也不是通过 comE 这个途径实现的。最近有报道讲高水平 CSP 和 comDE 基础表达量增高都会抑制转化发生[8,9],本研究结果提示这二者可能是通过了不同的途径抑制转化。同时本研究结果显示受到 comE 抑制的其它 4 个蛋白并未显示出受到 CSP

表 2 D39 菌株在 CSP 诱导后不同时间的转化率

批次	转化率(% × 10^{-3})		
	0 min	10 min	20 min
1	8.4	5.1	2.1
2	10.8	8.4	3.8
3	7.8	4.2	0.8

表 3 D39 菌株在 CSP 诱导后不同时间的 comE 基因 mRNA 表达

批次	comE/16SrRNA		
	0 min	10 min*	20 min
1	0.0341	0.9520	0.0402
2	0.1974	1.2047	0.1112
3	0.0124	0.4073	0.0160

*:$P<0.05$,CSP 诱导 10 min 时 comE 的表达量较 0 min 和 20 min 时显著增高



A. D39 菌株生长至 OD_{550}=0.10 时的全菌蛋白双向电泳图谱



B. △comE 菌株生长至 OD_{550}=0.09 时的全菌蛋白双向电泳图谱

图 1　comE 缺陷型和野生型双向凝胶电泳图谱



A. D39 菌株生长至 OD_{550}=0.10 时加入 100 μg/L CSP 之前的全菌蛋白双向电泳图谱



B. D39 菌株加入 100 μg/L CSP 后 10 min 时的全菌蛋白双向电泳图谱



C. D39 菌株加入 100 μg/L CSP 后 20 min 时的全菌蛋白双向电泳图谱

图 2　100 μg/L CSP 诱导 D39 后 0、10、20 min 双向凝胶图谱

的抑制，提示 comE 存在有独立于 CSP 的调控途径，但这些基因与转化的相关性不大，即 comE 可能还有调控转化以外的其它功能。

综上所述，操纵子 comCDE 对转化的调控机制比较复杂，并不是早期研究的单一性的正调控，其中还可能涉及其它调控因子及调控途径，而 CSP 和 comE 的功能也可能并不仅仅与细菌的转化相关，或仅仅通过转化而调控细菌相关的生物学功能，其具体机制尚需进一步研究。

转化是细菌基因重组的常见方式之一，大量研究证明细菌的转化与其进化、毒力因子和耐药性等生物学性状的表达密切相关[10,11]。本研究为进一步研究肺炎链球菌转化的分子机制提供了实验依据，有助于深入理解相关的毒力及耐药性调控，对肺炎链球菌感染的临床防治有一定的促进作用。

参 考 文 献

[1] hatmore A M, Barcus V A, Dowson C G. Genetic diversity of the streptococcal competence (com) gene locus[J]. J Bacteriol, 1999, 181(10): 3144-3154.

[2] Ween O, Gaustad P, Havarstein L S. Identification of DNA binding sites for comE, a key regulator of natural competence in streptococcus pneumoniae[J]. Mol Microbiol, 1999, 33(4): 817-827.

[3] Pinas G E, Cortes P R, Albarracín Orio A G, et al. Acidic stress induces autolysis by a CSP-independentComE pathway in streptococcus pneumoniae[J]. Microbiology, 2008, 154: 1300-1308.

[4] Trombe M C. Calcium signaling in Streptococcus pneumoniae: implication of the kinetics of calcium transport[J]. Microb Drug Resist, 1999, 5(4): 247-252.

[5] Regaud S C, Duthoit F, Mastrorillo L M, et al. Competence regulation by oxygen availability and by nox is not related to specific adjustment of central metabolism in Streptococcus pneumoniae[J]. J Bacteriol, 2001, 183(9): 2957-2962.

[6] Burghout P, Bootsma H J, Kloosterman T G. Search for genes essential for pneumococcal transformation: the RadA DNA repair protein plays a role in genomic recombination of donor DNA[J]. J Bacteriol, 2007, 189(1): 6540-6550.

[7] Echenique J R, Trombe M C. Competence modulation by the NADH oxidase of Streptococcus pneumoniae involves signal transduction[J]. J Bacteriol, 2001, 183(2): 768-772.

[8] Oggioni M R, Iannelli F, Ricci S, et al. Antibacterial activity of a competence-stimulating peptide in experimental sepsis caused by Streptococcus pneumoniae[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(12): 4725-4732.

[9] Guiral S, Henard V, Granadel C, et al. Inhibition of competence development in Streptococcus pneumoniae by increased basal-level expression of comDE two-component regulatory system[J]. Microbiol, 2006, 152(2): 323-331.

[10] Echenique J, Kadioglu A, Romao S, et al. Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in Streptococcus pneumoniae[J]. Infect Immun, 2004, 72(4): 2434-2437.

[11] Patrick B, Kathin M. Influence of the spxB gene on competence in Streptococcus pneumoniae[J]. J Bacteriol, 2008, 190(4): 1184-1189.

（责任编辑：冉明会）