论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1409-05

肺炎链球菌绿色荧光蛋白报告质粒的构建及评价

胥文春[1],单幼兰[2],许颂宵[1],王 虹[1],陈淑惠[1],尹一兵[1]

(1. 重庆医科大学检验系 临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室、重庆市重点实验室,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第二医院传染病实验室,重庆 400012)

【摘 要】目的:构建一个可高效报告基因表达的绿色荧光蛋白(Green fluorescence protein,GFP)报告质粒,为采用差异荧光诱导(Differential fluorescence induction,DFI)技术筛选肺炎链球菌(*Streptoccus pneumoniae*,*S.pn*)体内诱导的毒力基因奠定基础。方法:酶切质粒pGreenTIR的SD-ENH-GFP片段,将其插入含氯霉素抗性基因的自杀质粒pEVP3中,构建以绿色荧光蛋白为报告基因的自杀质粒pEVP3-SDGFP。再将肺炎链球菌的溶血素基因(Pneumolysin,ply)上游约500bp片段插入到该质粒报告基因上游的多克隆位点中,得到质粒pEVP3-SDGFP-Ply,将其转化入肺炎链球菌TIGR4 中,比较新建质粒pEVP3-SDGFP与同样处理质粒pEGFP-1(报告基因gfp前无SD及ENH序列)报告上游基因表达的情况。结果:通过体内、外实验证实新建质粒pEVP3-SDGFP不但可以报告肺炎链球菌溶血素基因的表达,并且其报告上游基因表达的能力明显强于质粒pEGFP-1。结论:所构建的质粒pEVP3-SDGFP可用于DFI筛选肺炎链球菌体内诱导基因所需启动子诱捕文库的构建。

【关键词】肺炎链球菌;绿色荧光蛋白;报告质粒

【中国图书分类法分类号】R392.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-16

Construction and evaluation of a high effective GFP reporter plasmid for *Streptococcus pneumoniae*

XU Wen-chun, et al

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To construct a high effective GFP reporter plasmid for screening *Streptoccus pneumoniae* virulent genes by differential fluorescence induction. *Methods*: The SD-ENH-GFP region of plasmid pGreenTIR was cloned into a suicide plasmid pEVP3 which contains a cat gene encoding resistance protein to chloramphenicol, and a report plasmid pEVP3-SDGFP was constructed. To evaluate the function of this plasmid, a 500bp fragment of the pneumolysin gene (ply) of TIGR4 was coloned in the upstream of gfp and then was transformed into *Streptococcus pneumoniae* TIGR4. *Results*: The plasmid pEVP3-SDGFP could report the expression of ply both in vivo and in vitro, and was more effective than plasmid pEGFP-1 without SD and ENH sequence before gfp gene. *Conclusion*: Plasmid pEVP3-SDGFP can be used to construct the promoter-trap library which is needed in DFI.

【Key words】*Streptococcus pneumonia*; Green fluorescence protein; Reporter plasmid

肺炎链球菌(*Streptoccus pneumoniae*,*S.pn*)是严重侵袭性感染(如脑膜炎、脓毒症、肺炎)和上呼吸道感染最重要的病原体之一,但肺炎链球菌致病的毒力基因目前尚未完全清楚。

差异荧光诱导(Differential fluorescence induction,DFI)技术是一种高通量的半自动筛选鉴定细菌毒力基因的方法,它具有如下优点:不影响特定基因的染色体拷贝数,即使是有基础背景表达的基因也可以鉴定其在不同条件下的表达差异,特别适用于分析弱启动子和瞬时表达的启动子,且它不干扰细菌在宿主体内的侵袭、扩散和增殖[1,2],因此该技术可用于筛选肺炎链球菌致病相关基因。

DFI技术的核心是构建启动子诱捕文库,该文库由大量以绿色荧光蛋白(Green fluorescence protein,GFP)为报告基因的含有细菌基因组DNA随机片段的自杀质粒组成,因此构建含有无启动子的gfp报告基因的自杀质粒是首要任务。本研究拟利用自杀质粒pEVP3为骨架,构建一个报告基因gfp前含有原核生物SD序列(Shine-dalgarno sequence)以及翻译增

作者介绍:胥文春(1968-),女,副教授,博士,
研究方向:病原微生物的致病机理及防治。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471838,30400376)。

强子（Enhancer of translation，ENH）的自杀质粒pEVP3-SDGFP，并与质粒pEGFP-1（报告基因gfp前无SD及ENH序列）相比较，鉴定其报告上游基因表达的能力，为采用DFI技术筛选肺炎链球菌体内诱导的毒力基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 肺炎链球菌血清4型标准菌株TIGR4（ATCC-BAA334），购自美国ATCC微生物菌种保存中心。大肠杆菌DH5α，由本实验室保存。pGreenTIR：含有SD序列和翻译增强子ENH，筛选标志为氨苄青霉素抗性基因Amp，美国加州大学伯克利分校Steven Lindow 教授惠赠。pEVP3：筛选标志为氯霉素抗性基因cat，由美国Illinois大学Morrison DA教授惠赠。pEGFP-1：pEVP3多克隆位点上插入了EGFP，本课题组构建。

1.1.2 试剂 质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、细菌DNA提取试剂盒均购自上海华舜生物工程公司；DNA连接试剂盒、各种限制性内切酶购自大连Takara公司；DNA聚合酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司。用于诱导肺炎链球菌形成感受态并发生转化的感受态刺激肽（competencec-stimulating peptide 2，CSP_2）由挪威生命科学大学Håvarstein LS惠赠。

1.1.3 仪器 美国BD公司 FACS Calibur 流式细胞仪。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒pEVP3-SDGFP的构建 分别增菌大肠杆菌DH5α（含pGreenTIR）和DH5α（含pEVP3），提取质粒DNA。同时用*BamH* Ⅰ酶切质粒pEVP3（单酶切）和pGreenTIR（ENH-SD-EGFP上下游各1个位点），取pEVP3酶切后去磷酸化产物和pGreenTIR约 800 bp片段回收产物按一定比例于16℃、过夜连接，转化入大肠杆菌感受态细胞，25 μg/ml氯霉素LB平板筛选，过夜培养。

1.2.2 重组质粒pEVP3-SDGFP的鉴定

1.2.2.1 PCR鉴定 用接种针从菌落上挑取少许细菌放入盛有10 μl 无菌ddH_2O的EP管中，沸水5 min后作为DNA模板，用质粒pEVP3多克隆位点两侧引物（P1 GTTGAAACTGCTGGTGCTCTTAA，P2TGCTTTCACTTTATTATCTTGG）进行PCR，30 μl反应体系，1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。预期应有约1 100 bp的片段。

1.2.2.2 酶切鉴定 对于PCR已扩增出约1 100 bp片段的菌落，用接种环挑取菌落剩余部分接种于含25 μg/ml氯霉素的LB培养基中，37℃，振荡过夜。以质粒小量抽提试剂盒提取重组质粒DNA，并用*Kpn* Ⅰ酶切，1%琼脂糖电泳。预期应有约800 bp的片段。

1.2.2.3 测序鉴定 将经PCR和酶切鉴定结果为阳性的质粒送本校分子诊断与感染性疾病教育部重点实验室测序，测序引物为质粒pEVP3多克隆位点两侧引物。

1.2.3 重组质粒pEVP3-SDGFP的评价

1.2.3.1 pEVP3-SDGFP-Ply质粒构建 提取肺炎链球菌TIGR4菌株基因组DNA，PCR扩增Ply基因283~754 bp片段，引物为Ply-up GCCGAGATCTAATAATCCCACTCTTCTTGC（含*Bgl* Ⅱ位点）和Ply-down ACAGCATGCCAGCCTCTACTTCATCACTC（含*Sph* Ⅰ位点）。同时用*Bgl* Ⅱ和*Sph* Ⅰ双酶切pEVP3-SDGFP和PCR扩增Ply产物，胶回收，16℃过夜连接，转化及筛选。以pEVP3多克隆位点两侧引物P1、P1进行PCR、酶切及测序鉴定。

1.2.3.2 转化重组质粒入肺炎链球菌TIGR4 肺炎链球菌的转化及筛选参见Lee等的文章[3]，做了适当修改。取-70℃保存的TIGR4菌株500 μl培养于10 ml培养基（含1 mmol/L的$CaCl_2$和0.2%BSA）中，当细菌达到一定菌密度时（OD_{550}=0.09~0.1），加入CSP_2 2 μl，加入重组质粒pEVP3-SDGFP-Ply 2 μl，37℃孵育90 min，然后铺于含氯霉素（2.5 μg/ml）的TSA血平板上，37℃孵箱培养20~24 h，挑取血平板上的转化菌落，于含氯霉素（2.5 μg/ml）的C+Y中增菌保存。以氯霉素（2.5 μg/ml）抗生素平板筛选和PCR扩增鉴定转化成功与否。将重组质粒pEVP3-GFP-Ply（pEGFP-1中插入Ply，但GFP前无SD位点）按上述方法转化入TIGR4。

1.2.3.3 体外荧光观察 荧光分光光度计测定：取冻存的细菌接种于TSA血平板，37℃培养16~18 h后，选取平板上5个大小一致的TIGR4菌落，接种于50ml C+Y培养基中，于接种后不同时间分别取3 ml离心，用同样体积的PBS重悬后，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。同样方法处理重组了质粒pEVP3-SDGFP-Ply和pEVP3-GFP-Ply的TIGR4。

荧光显微镜观察：当上述3株细菌在C+Y培养基中培养至6~8 h后离心，用PBS重悬（相同菌密度），浓缩后涂片，置于荧光显微镜下，蓝光激发，以10×20倍观察并照相。

流式细胞仪检测：当上述3株细菌在C+Y培养基中培养至6~8 h后离心，用PBS重悬（相同菌密度），用流式细胞仪分析，488 nm激发，检测有无发荧光的细菌。

1.2.3.4 小鼠体内荧光观察 选取体重在18~22 g 的BALB/c雌性小鼠12只，随机分为3组。将上述3株细菌在C+Y中培养至OD_{620}=0.6，分别取0.2 ml菌液注入各组小鼠腹腔。24 h后处死小鼠，取眼眶血，800 g离心5 min去掉血细胞后，取上清液再离心浓缩后涂片，置于荧光显微镜下，蓝光激发，以10×20倍观察并照相。

2 结 果

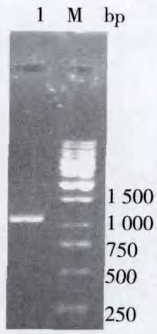
2.1 重组质粒pEVP3-SDGFP的构建与鉴定

PCR、酶切鉴定结果分别见图1、图2，结果均与预期相符。双向测序结果表明GFP正确插入到pEVP3中，且其上游含有翻译增强子TTAACTTTA、

核糖体结合位点SD序列。证明质粒构建成功。

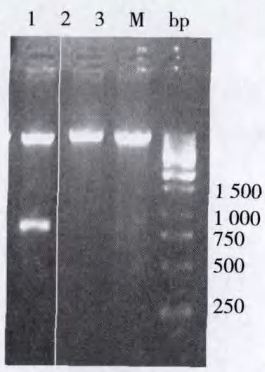
2.2 重组质粒pEVP3-SDGFP的评价

2.2.1 重组质粒pEVP3-SDGFP-Ply的构建与鉴定 PCR鉴定预期应得到约1.3 kb条带，结果表明6个菌落均有此片段（图3），初步证实连接成功。酶切鉴定，有约500 bp片段，与预期相符（图4）。测序结果也与预期相符。



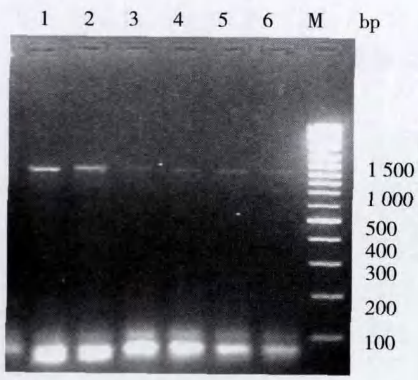
1. PCR 产物；M. DNA marker

图 1 重组质粒 pEVP3-SDGFP 的 PCR 鉴定结果



1. 正确链接；2~3. 错误链接；M. DNA marker

图 2 重组质粒 pEVP3-SDGFP 的酶切鉴定结果



1~6. pEVP3-SDGFP-Ply中ply的PCR产物；M. DNA marker

图3 重组质粒pEVP3-SDGFP-Ply的PCR鉴定结果

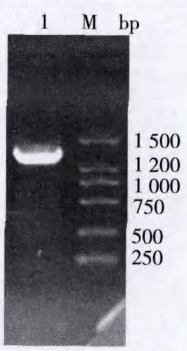
2.2.2 转化重组质粒入肺炎链球菌TIGR4 抗生素平板筛选：含氯霉素（2.5 μg/ml）的TSA血平板上有



1. 质粒 pEVP3-SDGFP-Ply；2. pEVP3-SDGFP-Ply质粒 *Bgl* Ⅱ、*Xba* Ⅰ双酶切结果；M. molecular size marker

图 4 重组质粒 pEVP3-SDGFP-Ply 的酶切结果

大量的细菌生长，菌落有草绿色溶血环，无色，直径1~2 mm，肚脐样，呈典型的肺炎链球菌菌落。说明质粒pEVP3-SDGFP-Ply上的氯霉素抗性基因通过同源重组整合到了肺炎链球菌中，转化成功。PCR扩增：提取同源重组肺炎链球菌DNA，用引物Ply-up和P2以此为模版进行PCR扩增，如果肺炎链球菌DNA上同源重组了pEVP3-SDGFP-Ply，应得到约1 300 bp的Ply-TIR-SD-GFP片段。结果与预期相符（图5）。



1. 重组 *S.pn* 中 Ply-TIR-SD-GFP 片段的 PCR 产物；M. DNA marker

图 5 *S.pn* 插入片断的 PCR 鉴定

2.2.3 体外培养后荧光强度检测 3株细菌体外培养后荧光强度见图6，荧光显微镜观察结果见图7，流式细胞仪分析结果如图8。3种方式检测结果均表明同源重组了质粒pEVP3-SDGFP-Ply的肺炎链球菌比同源重组了质粒pEVP3-GFP-Ply的肺炎链球菌的荧光更强，即在同样的ply表达情况下，重组质粒pEVP3-SDGFP-Ply上的gfp报告上游基因表达的能力更强。

2.2.4 小鼠体内报告Ply结果 小鼠体内，未重组质

粒的肺炎链球菌几乎无荧光，同源重组了质粒pEVP3-SDGFP-Ply的肺炎链球菌比同源重组了质粒pEVP3-GFP-Ply的肺炎链球菌的荧光密度大（图9）。

3 讨 论

GFP是一类存在于水母、水螅和珊瑚等腔肠动物体内的生物发光蛋白，受蓝光激发后，能发出波长

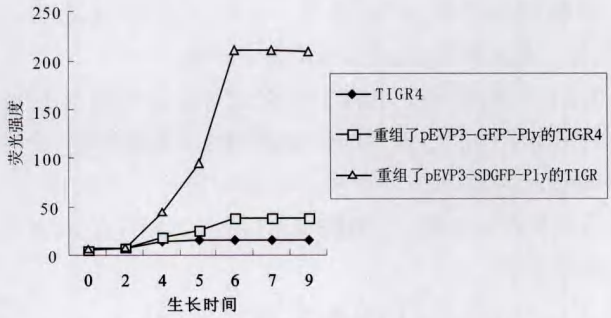
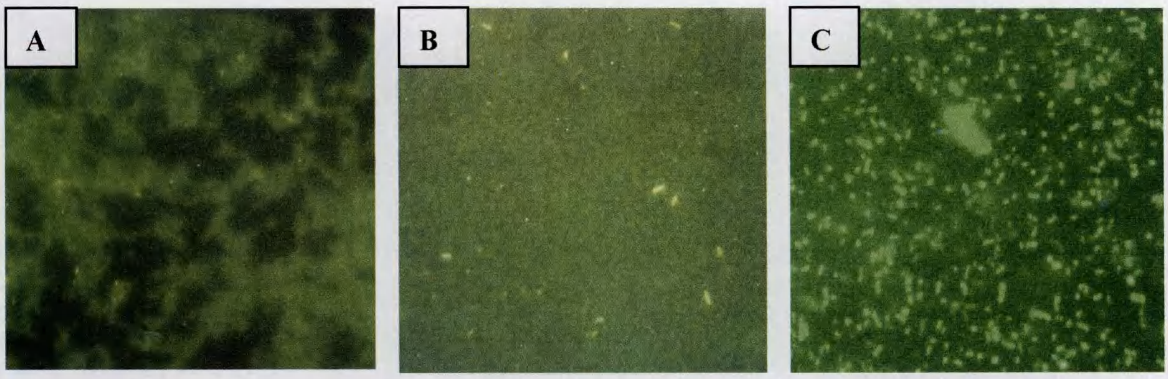
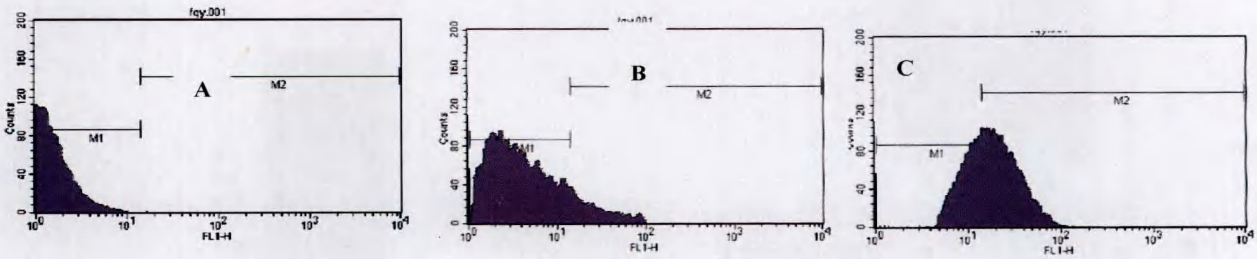


图6 *S.pn*体外生长的时间-荧光曲线



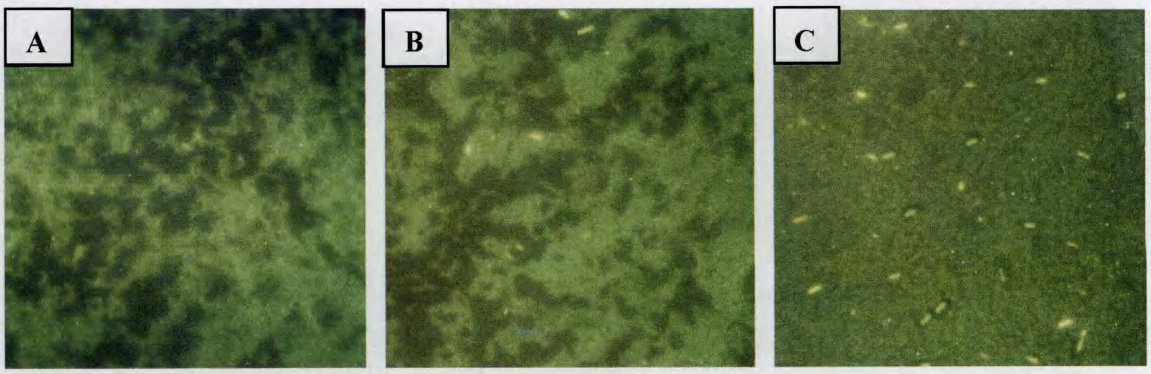
A. 未重组质料的 TIGR4；B. 重组质粒 pEVP3-GFP-Ply 后的 TIGR4； C. 重组质粒 pEVP3-SDGFP 后的 TIGR4

图 7 重组不同报告质粒的 *S.pn* 体外培养后荧光观察



A. 未重组质料的 TIGR4；B. 重组质粒 pEVP3-GFP-Ply 后的 TIGR4； C. 重组质粒 pEVP3-SDGFP 后的 TIGR4

图8 重组不同报告质粒的*S.pn*体外培养后流式细胞仪分析结果



A. 未重组质料的 TIGR4；B. 重组质粒 pEVP3-GFP-Ply 后的 TIGR4； C. 重组质粒 pEVP3-SDGFP 后的 TIGR4

图 9 重组不同报告质粒后 *S.pn* 体内荧光观察

为510 nm的绿色荧光，目前它作为活细胞的分子探针已广泛应用于细胞生物学和分子生物学等研究领域[4,5]。GFP有多种变异体，其中突变型绿色荧光蛋白（Mutant GFP）或增强型绿色荧光蛋白(Enhenced GFP,EGFP)的荧光强度比野生型GFP高40~80倍，且其蛋白折叠成能够发出荧光的时间也较野生型大大缩短，其半衰期为24 h，因此应用最广。本实验中采用的GFP即为突变型绿色荧光蛋白。

构建报告病原菌基因表达的载体是筛选体内诱导基因的关键。首先报告基因应不含启动子序列，除此之外另一个重要因素是报告基因的上游应含有RBS，即SD序列，这样无论报告基因上游插入什么序列，都不用考虑其开放读码框的一致性，只要其启动子能启动报告基因的转录，报告基因都会正确表达。

pEVP3是一种自杀质粒，它含有杆菌的复制起始子(ori)，使其可以在大肠杆菌中复制，却不能在肺炎链球菌中自主复制。若质粒中存在与肺炎链球菌基因同源的序列，一旦该质粒被转化进入肺炎链球菌，质粒不能自主复制，其DNA则被整合到肺炎链球菌基因组中相应位置，随基因组DNA的复制而复制，又称为自杀性同源重组。在此过程中，有可能会使肺炎链球菌中该序列所对应的基因不能正确表达，但可通过其下游的报告基因表达与否了解该基因启动子被诱导的情况，因此不影响体内诱导基因的筛选。

构建无启动子的绿色荧光蛋白为报告基因的自杀质粒是采用DFI筛选体内表达基因的第一步。由于载体DNA通过自杀性同源重组整合到*S.pn*染色体上，因此该质粒上的gfp在*S.pn*中只有一个拷贝，报告中等强度或弱启动子有一定难度。本实验利用自杀质粒pEVP3为骨架，将质粒pGreenTIR的无启动子的绿色荧光蛋白及其上游的翻译起始区域(Translation initiation region,TIR)克隆到pEVP3中，得到新的自杀质粒pEVP3-SDGFP。该质粒具有如下特点：①可以在大肠杆菌中复制，不能在肺炎链球菌中自主复制。②带有氯霉素抗性基因，该耐药基因有自身的启动子可以自动表达，而不受宿主菌基因表达的影响，使转化菌株具有该抗生素的抗性，从相应的抗生素平板上即可以筛选出转化菌株。③以无启动子的突变型绿色荧光蛋白作为报告基因，上游存在启动子时报告基因才能表达。④最重要的是报告基因与上游多克隆位点之间连接有ENH和原核生物共有的SD，ENH可增加GFP的合成，有利于中等强度或弱启动子的表达；SD序列能确保报告基因的正确表达。

为了保证mutant GFP序列的正确性，本实验不是通过PCR扩增，而是通过酶切直接将质粒pGreenTIR的此段序列及其上游的TIR克隆到质粒pEVP3的多克隆位点中，避免了PCR扩增过程中有可能出现的突变发生，并经过DNA测序证实了此段序列被正确克隆。为了解新建质粒pEVP3-SDGFP报告上游基因表达的情况，我们将肺炎链球菌的溶血素基因ply上游约500 bp片段插入到该质粒告基因上游的多克隆位点中，得到质粒pEVP3-SDGFP-Ply，将其转化入肺炎链球菌TIGR4 中，由于溶血素基因在体内、外均可表达，通过体内、外实验证实其不但可以报告肺炎链球菌溶血素基因的表达，并且比以前构建的质粒pEGFP-1报告上游基因表达的能力显著增强。因此本实验成功构建了肺炎链球菌绿色荧光蛋白报告质粒pEVP3-SDGFP，可以用于DFI筛选肺炎链球菌脑组织内诱导基因所需的启动子诱捕文库的构建。

参 考 文 献

[1] Bumann D,Valdivia R H. Identification of host-induced pathogen genes by differential fluorescence induction reporter systems[J]. Nat Protoc,2007,2(4):770-777.

[2] Marra A,Asundi J,Barstilson M,et al. Differential fluorescence induction analysis of Streptococcus pneumoniae identifies genes involved in pathogenesis[J]. Infect Immun,2002,70(3):1422-1433.

[3] Lee M S,Morrison D A. Identification of a New Regulator in Streptococcus pneumoniae Linking Quorum Sensing to Competence for Genetic Transformation[J]. Journal of Bacteriology,1999,181(16):5004-5016.

[4] Ciu W,Niwa Y,Zeng W,et al. Engineered GFP as a vital reporter in plants[J]. Curr Biol,1996,6(3):325-330.

[5] Samel S,Keese M,Laning S,et al. Supplementation and inhibition of nitric oxide synthsis influences bacterial transit time during bacterial translocation in rats[J]. Shock,2006,19(4):78-82.

[6] Acebo P,Nieto C,Corrales M A,et al. Quantitative detection of Streptococcus pneumoniae cells harbouring single or multiple copies of the gene encoding the green fluorescent protein[J]. Microbiology,2000,146(Pt 6):1267-1273.

[7] Claverys J P,Dintilhac A,Pestova E V,et al. Construction and evaluation of new drug-resistance cassettes for gene disruption mutagenesis in Streptococcus pneumoniae, using an ami test platform[J]. Gene,1995,164(1):123-128.

（责任编辑：冉明会）