

呼吸与危重症

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001774

肺炎链球菌 MarR 家族蛋白 SPD_0379 通过调节基因 *rafX* 的表达调控磷壁酸的合成

张竞辉¹, 叶唯洁², 张雪梅², 尹一兵², 孟江萍¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:明确肺炎链球菌 MarR 家族蛋白 SPD_0379 对细菌磷壁酸(teichoic acids, TA)的调控作用。**方法:**通过凝胶阻滞实验验证 SPD_0379 蛋白与 *rafX* 基因启动子序列的结合, 通过 *LacZ* 报告基因观察细菌在 *spd_0379* 基因缺陷后的 *rafX* 基因表达变化, 通过斑点杂交、ELISA 和流式细胞术检测细菌磷壁酸的含量变化, 通过生长曲线分析揭示 SPD_0379 蛋白在细菌生长中的作用。**结果:**SPD_0379 蛋白与 *rafX* 基因启动子序列发生特异性结合, *spd_0379* 基因缺陷后, 细菌的 *rafX* 基因表达上调($t=10.010$, $P=0.001$), 免疫斑点与 ELISA 均显示磷壁酸含量明显升高($t=5.848$, $P=0.004$; $t=4.653$, $P=0.001$), 且缺陷菌的自溶较野生菌明显提前。**结论:**SPD_0379 蛋白负调控 *rafX* 基因的表达, 抑制细菌磷壁酸的合成, 参与细菌自溶的调控。

【关键词】肺炎链球菌; 磷壁酸; MarR 家族蛋白**【中图分类号】**R378.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-01-25

Pneumococcal MarR family protein SPD_0379 regulating the expression of gene *rafX* and the biosynthesis of teichoic acids

Zhang Jinghui¹, Ye Weijie², Zhang Xuemei², Yin Yibing², Meng Jiangping¹

(1. Assisted Reproductive Center, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Diagnostic Medicine Designated

by the Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To determine the regulative effect of *Streptococcus pneumoniae* MarR family protein SPD_0379 on the biosynthesis of teichoic acid. **Methods:** EMSA was employed to analyze whether protein SPD_0379 bound to *rafX* gene promoter sequence. The change of bacterial *rafX* gene expression was observed by *LacZ* reporter gene. Dot blot, ELISA techniques and flow cytometry analysis were implemented to reveal the change of the concentration of teichoic acid. **Results:** A specific binding between proteins SPD_0379 and *rafX* gene promoter sequence was observed. After *spd_0379* gene deficiency, the expressions of bacterial *rafX* gene were up-regulated ($t=10.010$, $P=0.001$), with the concentration of teichoic acid significantly up-regulated in D39Δ*spd_0379* detected by both dot blotting and ELISA ($t=5.848$, $P=0.004$; $t=4.653$, $P=0.001$), and the autolysis of *spd_0379* deficient strains were significantly earlier than wide type D39. **Conclusion:** Protein SPD_0379 regulates the expression of *rafX* gene, inhibits the synthesis of bacterial teichoic acid, and is involved in the regulation of bacterial autolysis.

【Key words】*Streptococcus pneumoniae*; teichoic acid; MarR family proteins肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, Spn)是导

作者介绍: 张竞辉, Email: heinz2513@gmail.com,

研究方向: 肺炎链球菌的致病机制。

通信作者: 孟江萍, Email: mjilily2000@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81772153)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180530.1027.006.html>

(2018-05-30)

致社区获得性感染的常见病原菌, 也是 5 岁以下儿童感染致死的首要致病菌^[1]。由于耐药菌比例的不断攀升以及并不理想的疫苗保护作用, 对该菌的致病机制研究仍是控制其感染致病的首要任务。磷壁酸是该菌的一种重要毒力因子, 参与细菌的定植与侵袭^[2]。然而到目前为止, 没有关于其生物合成途径

调控作用的相关报道。

MarR 家族蛋白是细菌中广泛存在的一种转录调控蛋白,它们通过翼状螺旋-折叠-螺旋(HTH)的特殊蛋白结构同 DNA 结合,大部分 MarR 家族蛋白都具有转录抑制因子的作用,但也有少数蛋白为转录激活子。MarR 蛋白最初在大肠杆菌中作为多重耐药的 marRAB 操纵子的抑制子被鉴定出来。目前发现 MarR 家族蛋白参与包括细菌多药耐药、有毒化合物抵抗等多种生理功能,在细菌适应宿主环境和致病过程中发挥着重要作用^[3]。

在本课题组前期研究中,发现基因 *rafX* (*sdp_1672*) 的表达产物可作为磷壁酸连接酶参与 *S.pn* 的磷壁酸合成^[4],而进一步研究显示,一个 MarR 家族蛋白 SPD_0379 蛋白可能与基因 *rafX* (*sdp_1672*) 的启动子区域有结合,提示 SPD_0379 蛋白可能具有转录因子活性,参与细菌磷壁酸合成的调控。本研究在鉴定 SPD_0379 蛋白与 *rafX* 基因启动子有特异性结合的基础上,通过报告基因的方法观察 *rafX* 基因表达和细菌磷壁酸的变化,以确定 SPD_0379 蛋白对细菌磷壁酸的调控作用。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒与生长条件

NCTC7466 (D39) 购自英国菌种保存中心。大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) BL21 (DE3)、*E.coli* DH5 α 和 pET28a 载体为本实验保存菌种及质粒。*E.coli* 培养使用 Luria-Bertani (LB) 平板或 LB 培养基,在 37 °C 条件下生长;*S.pn* 培养使用血平板或 C+Y 半合成培养基^[5],培养于 37 °C 5% CO₂

条件下。

1.2 主要试剂

PrimeSTAR DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、DNA marker 及蛋白质 Marker 均购自 Takara 公司;DNA 片段纯化试剂盒为美国 Roche 公司产品;T4 DNA 连接酶、EMSA 试剂盒和铝佐剂购自 Thermo Fisher SCIENTIFIC (中国) 有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;质粒小量提取试剂盒、硫酸卡那霉素为美国 OMEGA bio-tek 公司产品; β 半乳糖苷酶报告基因检测试剂盒购自碧云天生物技术研究;抗磷壁酸多糖抗体 (Anti-CWPS) 为丹麦 Statens Serum Institut 产品;HRP 标记的山羊抗兔、鼠二抗购自美国 KPL 公司;IPTG 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;咪唑为美国 BBI 公司产品;红霉素、氯霉素、脱氧胆酸盐 (sodium deoxycholate, DOC) 和 30% (w/v) 丙烯酰胺/甲叉双丙稀酰胺溶液均购自上海生工生物有限公司;引物由华大基因合成,序列见表 1。

1.3 SPD_0379 重组蛋白的表达纯化

以 D39 全基因组为模板进行 PCR 扩增,使用 *spd_0379* F/R 引物扩增 *spd_0379* 基因全长,目的片段扩增长度为 454 bp。PCR 产物与质粒分别使用 *Eco*R I 和 *Xho* I 2 种限制性内切酶进行双酶切,使用 T4 连接酶与线性 pET28 α 质粒连接,连接产物通过热激法转化感受态 *E.coli* BL21 (DE3)。通过 PCR 和双酶切鉴定阳性单克隆,将单克隆扩大培养,送北京六合华大基因科技股份有限公司进一步测序验证。

将测序正确的转化子接种至 20 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 振荡培养约 8 h,将活化后的菌液按 1:50 接种至 500 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 °C、180 r/min 振荡培养约 4 h,当用分光光度计测得 600 nm 处吸光度 (absorbance, A) 值约 0.4 时 ($A_{600\text{nm}}=0.4$),加入 0.5 mmol/L 的 IPTG,20 °C、100 r/min 诱导培养过夜。离心集菌,超声破碎,收集上清液,然后使用 Ni²⁺-

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')
<i>spd_0379</i> F	GGAATTCATATGGACTACCAACGAATCAAT
<i>spd_0379</i> R	CCGCTCGAGTTATTTCAAATCCTCCAAAAAT
erm F	CCGGGCCCAAAATTTGTTTGA
erm R	AGTCGGCAGCGACTCATAGAAT
<i>spd_0379</i> UP F	TATGACAGGAGAGGCTTTAAC
<i>spd_0379</i> UP R	ATCAAACAAATTTTGGGCCCGG-TTTTCATATCCCTCCTTCTTC
<i>spd_0379</i> DW F	ATTCTATGAGTTCGCTGCCGACT-CTGCATAAACGCTTCCACAAGG
<i>spd_0379</i> DW R	GCGGTTAAGTCAAAAGCAAAGGC
<i>spd_0379</i> -pJW F	GGACTAGTATGGACTACCAACGAATCAAT
<i>spd_0379</i> -pJWR	ATAAGAATGCGGCCGCTTATTTCAAATCCTCCAAAAAT
<i>rafX</i> F	AGCCTTGATATGGTGGATAAAATAG
<i>rafX</i> R	TAATTCCTCAATAAAATCAGCTCTTT

NTA 柱进行亲和层析,用含不同浓度咪唑的洗脱液梯度洗脱,经 12% 的 SDS-PAGE 分离,可观察到在 80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的洗脱液获得含量最高的目的蛋白,将纯化后的蛋白洗脱液使用 5 kD 的超滤膜进行超滤浓缩, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 EMSA 验证 SPD_0379 重组蛋白与 *rafX* 启动子序列的结合

以生物素标记 5' 的引物(*rafX* F, *rafX* R)通过 PCR 扩增 *rafX* 启动子区域获得 DNA 探针,探针使用 PCR 产物纯化试剂盒纯化,将探针与 SPD_0379 重组蛋白于反应体系共孵育中,反应体系为:结合缓冲液 2.0 μL , poly(dI:dC) 1 μL , DNA 探针 1.0 μL , 重组蛋白 0~8 μg , 使用 8 μg 重组 LytR 蛋白作为阴性对照,余下用 ddH₂O 补足至总体积为 20 μL 。共孵育 20 min 后进行非变性凝胶电泳,100 V, 1 h, 然后电转至尼龙膜,380 mA, 45 min, 再将膜置于紫外灯下约 10 cm 高度进行紫外交联 10 min, 后操作均参照试剂盒说明书进行。使用化学发光底物成像。

1.5 SPD_0379 缺陷菌 D39 Δ *spd_0379* 的构建及鉴定

采用引物 *erm* F 和 *erm* R 扩增红霉素抗性基因片段 *erm*, 采用引物 *spd_0379* UP F 和 *spd_0379* UP R 扩增 *spd_0379* 基因上游 DNA 片段, 采用 *spd_0379* DW F 和 *spd_0379* DW R 扩增 *spd_0379* 基因下游 DNA 片段, 使用长臂同源多聚酶链式反应(LFH-PCR)技术, 将 *spd_0379* 基因替换为红霉素耐药基因(*erm*), 获得含 *spd_0379* 上下游片段的红霉素盒(*erm* cassette), 通过同源重组将该片段转化于肺炎链球菌 D39 或 D39 *spd_1672::lacZ*(该菌株中 *spd_1672* 基因与 *LacZ* 基因融合表达, 可根据 *LacZ* 的表达产物 β -半乳糖苷酶活性高低反映 *spd_1672* 基因的转录水平)^[4]。采用含红霉素(0.25 mg/mL)的血平板筛选阳性克隆, 通过 PCR 鉴定并测序, 确定菌株中的 *spd_0379* 基因被 *erm* 基因所替代, 即获得 D39 Δ *spd_0379* 和 D39 *spd_1672::lacZ* Δ *spd_0379* 缺陷菌株。

1.6 β -半乳糖苷酶检测实验

在 C+Y 培养基中培养肺炎链球菌, 至 $A_{600\text{nm}}$ 约为 0.5 时, 12 000 r/min 离心 2 min 收集 500 μL 菌液(约 10^7 CFU), 沉淀用 PBS 洗涤 2 次后, 重悬于 500 μL PBS(含 0.1% triton X-100), 室温孵育 15 min 完全裂解细菌, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清 50 μL 加入 96 孔板, 然后每孔加入 β -半乳糖苷酶检测试剂 50 μL , 充分混合后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30 min 至样品孔出现浅黄色后, 加入终止液 150 μL , 在酶标仪 450 nm 波长处测定 A 值, 以检测报告基因的表达情况。

1.7 斑点杂交法检测磷壁酸含量

采用斑点杂交法进行磷壁酸含量测定, 将 D39 和 D39 Δ *spd_0379* 在 C+Y 培养基中培养至 $A_{600\text{nm}}=0.5$ 左右, 离心集菌, 采用 0.5% DOC 裂解细胞, 再分别按 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320 进行稀释, 点样: 将稀释好的 2 组标本, 每个标本 5 μL 分 2 次点在活化后的尼龙膜上, 室温晾干, 5%

BSA 封闭, 一抗采用肺炎链球菌磷壁酸多糖一抗(1:2 000), 二抗使用 HRP 标记的羊抗兔抗血清(1:8 000), 利用 ECL 显剂检测, 分析菌体中磷壁酸含量的变化。使用 ImageJ 软件对免疫斑点的化学发光强度进行定量分析。

1.8 ELISA 法检测磷壁酸含量

采用 ELISA 法进行磷壁酸含量测定, 具体步骤如下: 将 D39 和 D39 Δ *spd_0379* 培养至 $A_{600\text{nm}}=0.5$ 左右, 离心集菌, 采用 0.5% DOC 裂解细胞, 加入 100 μL 全菌裂解液于 96 孔板中 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, 洗板 3 次后, 用 200 μL 2% BSA 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, 洗板 3 次后, 加入 100 μL 磷壁酸多糖一抗(1:2 000)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗板 6 次后加入 100 μL HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min, 洗板 6 次, 然后使用 TMB 底物显色, 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 于 450 nm 处检测光密度值。

1.9 流式细胞仪检测磷壁酸含量

将肺炎链球菌 D39 野生菌和 D39 Δ *spd_0379* 缺陷菌接种于 C+Y 中培养至 $A_{620\text{nm}}=0.4$, 离心后将 1×10^6 CFU 细菌重悬至 200 μL 的 5% FBS(胎牛血清 PBS)中, 加入 1 μL 的 Anti-CWPS 抗体 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, PBS 洗 2 次后加入 200 μL PE 标记的山羊抗兔 IgG(1:200)及同型对照, PBS 洗 3 次后离心, 使用 200 μL PBS 重悬, 送生命科学院流式分析。

1.10 生长曲线

分别挑取血平板上过夜活化的 D39 野生菌株、D39 Δ *spd_0379* 缺陷菌的单个菌落, 接种于 5 mL C+Y 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 每隔 0.5 h 进行 $A_{620\text{nm}}$ 测定, 记录光密度。以光密度为纵坐标, 时间为横坐标绘制细菌的生长曲线。

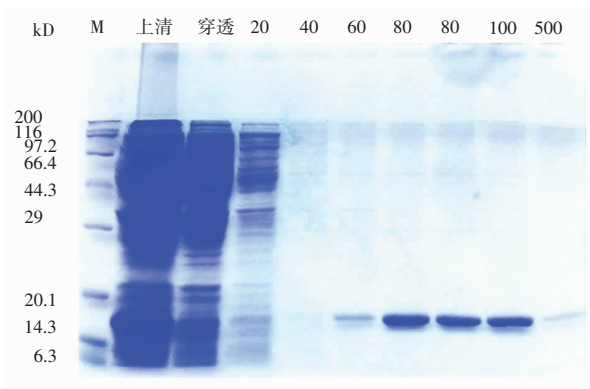
1.11 统计方法

应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异用两独立样本 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 SPD_0379 重组蛋白的诱导表达及纯化

将 *spd_0379* 基因全长扩增插入 pET28 α 质粒中, 转化到大肠杆菌中进行测序鉴定, 其序列与预期一样, 无突变。即通过 IPTG 诱导重组菌 pET28 $\alpha::spd_0379$ /BL21(DE3), 通过 SDS-PAGE 检测, 如图 1 所示, 表达菌上清中在分子量 Marker 的 14.3 kD 与 20.1 kD 之间有 1 条明显的蛋白条带, 与预期的 SPD_0379 蛋白大小一致(16.74 kD)。将其上 Ni²⁺-NTA 亲和柱后, 采用不同浓度咪唑进行, 在 60~500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围都能获得 SPD_0379 蛋白。收集纯度较高的 80 mm 咪唑洗脱液超滤浓缩, 获得纯度可达 90% 的 SPD_0379 重组蛋白, 可用于后续的实验。

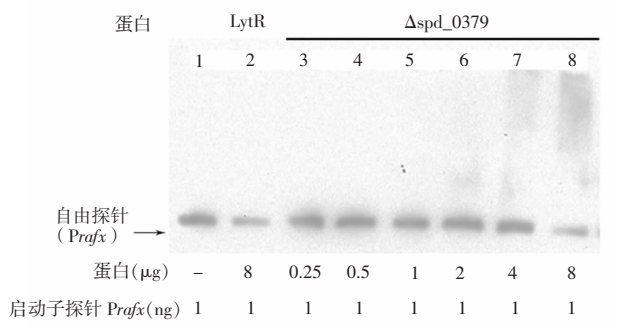


M: 蛋白 marker; 上清: 裂菌产物上清; 穿透: 蛋白挂柱后穿透液; 条带 4~10: 梯度洗脱液

图 1 SPD_0379 蛋白的表达及纯化结果 PAGE 图

2.2 EMSA 验证 SPD_0379 重组蛋白与 *rafX* 基因启动子区域的相互作用

EMSA 结果显示(图 2), SPD_0379 蛋白可与 *rafX* 启动子区发生结合, 而且随着蛋白浓度(0.25~8 μg)增加, 电泳滞后的条带密度不断增加, 提示蛋白结合的探针量不断增强。而加入生物素标记 *rafX* 启动子探针及无关蛋白 LytR 时(LytR 重组蛋白含量为 8 μg), 探针滞后的条带消失, 提示探针不被无关蛋白 LytR 结合, 这些结果说明 SPD_0379 重组蛋白与 *rafX* 启动子序列有特异性结合。



1: 未加入蛋白, 空白对照组; 2: 加入无关蛋白 LytR, 阴性对照组; 3~8: 加入不同浓度 SPD_0379, 实验组

图 2 EMSA 检测 SPD_0379 重组蛋白与 *rafX* 基因启动子片段的结合

2.3 *spd_0379* 基因的缺陷导致 *rafX* 基因的表达上调

将 D39 和缺陷菌 D39 Δspd_{0379} 培养至 $A_{600\text{nm}}=0.5$ 左右, 检测各自的 β -半乳糖苷酶活性, 结果显示(图 3)缺陷菌的 β -半乳糖苷酶活性较 D39 明显上调, 平均上调倍数为 (0.379 ± 0.038) 倍($t=10.010$, $P=0.001$), 提示 *rafX* 基因在缺陷菌中的表达增加, 提示 SPD_0379 蛋白对 *rafX* 基因的表达负调控作用。

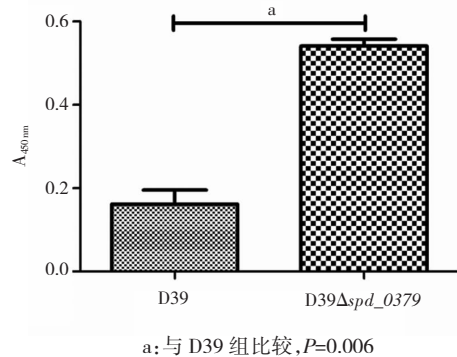


图 3 D39 和缺陷菌 D39 Δspd_{0379} 的 β -半乳糖苷酶活性检测

2.4 磷壁酸含量检测

本研究采用了 3 种方法进行细菌磷壁酸的检测: 斑点杂交法(图 4)检测显示 D39 Δspd_{0379} 较野生菌 D39 的磷壁酸含量明显升高, 以 D39 的平均化学发光强度为参照, 通过定量分析, 可以观察到缺陷菌的磷壁酸含量升高了 (5.286 ± 0.904) 倍($t=5.848$, $P=0.004$), ELISA 法(图 5)获得了相似的结果, 相较野生菌, 缺陷菌磷壁酸含量增高 (0.518 ± 0.111) 倍($t=4.653$, $P=0.001$), 而流式细胞法检测也显示(图 6), D39 Δspd_{0379} 表面结合的抗磷壁酸抗体较野生菌增多, 提示 D39 在缺陷 SPD_0379 后, 细菌表面的磷壁酸含量明显升高。

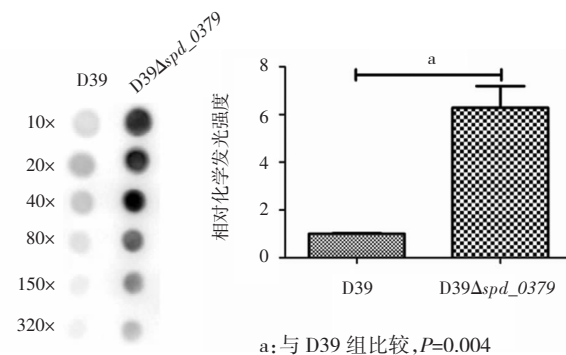


图 4 斑点杂交检测 D39 和 D39 Δspd_{0379} 缺陷菌的磷壁酸含量

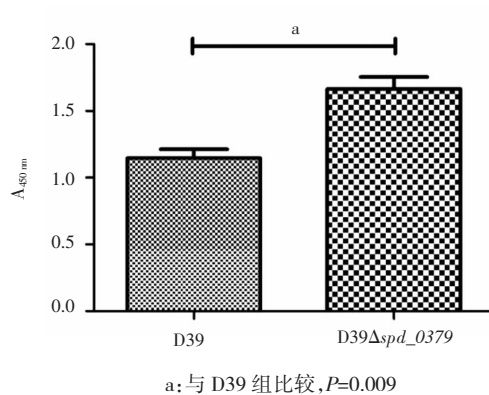
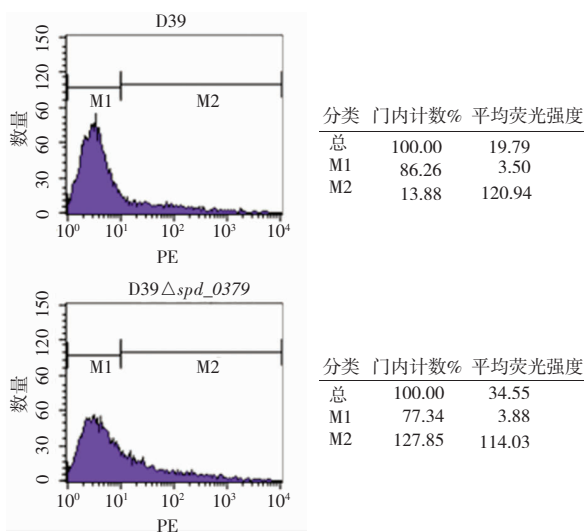


图 5 ELISA 检测 D39 和缺陷菌 D39 Δspd_{0379} 的磷壁酸含量



注: 上图为野生菌 D39, 下图为 D39 Δ spd_0379 菌, M2 区域代表磷壁酸含量

图 6 流式细胞术检测 D39 和缺陷菌 D39 Δ spd_0379 细胞表面的磷壁酸含量

2.5 spd_0379 基因的缺陷后细菌自溶提前

将 D39 和 D39 Δ spd_0379 菌接种至 10 mL 的 C+Y 中培养过夜, 然后按 1:50 的比例将细菌接种至 C+Y 中, 每隔 1 h 检测 600 nm 处的 A 值, 绘制其生长曲线。结果显示, 缺陷菌的生长速度较野生菌稍慢, 且没有平台期, 到达最高密度后即发生快速自溶(图 7)。

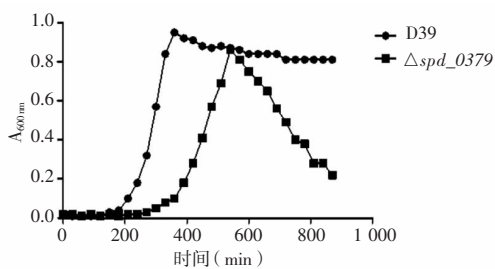


图 7 D39 和缺陷菌 D39 Δ spd_0379 的生长曲线图

3 讨论

磷壁酸是革兰阳性细菌细胞壁的重要组成部分, 根据其锚定部位不同, 被分为 2 种类型: 与肽聚糖共价连接的壁磷壁酸(wall teichoic acid, WTA)和镶嵌于细胞膜脂质的脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)^[6]。

研究显示, 磷壁酸具有许多重要的生理功能, 包括: 结合细菌表面蛋白, 影响细胞壁水解酶的活性, 调节细菌的生长和分裂, 抵抗抗菌肽与溶菌酶, 并通过与宿主的相互作用, 参与细菌致病^[7]。如 B 型

链球菌细胞壁表面的 LTA 可介导细菌与组成血脑屏障的人脑微血管内皮细胞相互作用, 增加其粘附侵袭, 导致脑膜炎的发生^[5]。而金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S.au*)的磷壁酸可抵抗天然阳离子抗菌肽 LL-37 的杀伤作用^[8]。

S.pn 的磷壁酸构成极为特殊, 与大多数革兰阳性菌不同, 其壁磷壁酸和脂磷壁酸含有相同的重复单元结构, 包含多种糖分子, 同时伴有磷酸胆碱修饰等^[9-10]。*S.pn* 的磷壁酸具有多种生理功能, 磷壁酸表面的磷酸胆碱残基(P-Cho)可以与宿主血小板活化因子受体(platelet-activating factor receptor, rPAF)发生直接相互作用, 介导 *S.pn* 对宿主呼吸道上皮细胞和血管内皮细胞的粘附、侵袭, 导致感染发生^[11]。近期研究指出, 在急性肺炎模型和系统性感染模型中, 脂磷壁酸的缺陷会导致细菌毒力的降低^[12]。提示 *S.pn* 可同调控磷壁酸等毒力因子的表达促进细菌的致病。

S.pn 磷壁酸的合成是一个复杂的过程, 壁磷壁酸和脂磷壁酸共用了相同的重复单元合成途径, 形成以 GalNAc(P-Cho)-GalNAc(P-Cho)-Rib-P-Glc-AATGa 为重复单元的复杂结构, 然后分别通过不同的基因控制连接于肽聚糖和细胞膜上。在磷壁酸重复单元链的合成过程中, 有 4 个操纵子下的 16 个基因参与合成过程^[6]。但尚不清楚磷壁酸前体是如何连接到细胞壁表面或锚定到细胞膜上的, 有文献提示 *psr* 或 *lytR* 两个基因可能参与此过程, 但尚无确切的实验证据^[6]。而目前尚未见磷壁酸合成相关基因表达调控的研究报道。

本课题组前期研究发现, 基因 *rafX* 参与 *S.pn* 的磷壁酸合成, *RafX* 蛋白可能具有磷壁酸链接酶活性, 参与 *S.pn* WTA 在细胞表面合成^[4]。通过 DNA pull-down 技术, 发现了一个 MarR 家族蛋白 SPD_0379 蛋白可能与基因 *rafX* 的启动子区域有结合, 提示 SPD_0379 蛋白可能参与了细菌磷壁酸的调控。为此, 本研究通过合成生物素标记的 *rafX* 启动子序列, 采用凝胶电泳迁移率实验(EMSA)鉴定了 SPD_0379 蛋白确实与它的特异性结合, 提示 SPD_0379 蛋白可能具有转录因子的活性, 参与调控 *rafX* 基因的表达。

本研究通过将 *LacZ* 报告基因与 *rafX* 基因融合表达, 发现 *spd_0379* 基因缺陷后, D39 菌株的 β -半

乳糖苷酶活性明显升高,表明 *rafX* 基因的表达在缺陷菌中明显升高,提示 SPD_0379 蛋白对 *rafX* 基因的表达为负调控作用。这与文献报道的大部分 MarR 蛋白都发挥转录抑制因子的作用相一致。进一步的磷壁酸检测结果发现,*spd_0379* 基因缺陷菌的磷壁酸较野生 D39 明显增加,斑点杂交、ELISA 和流式细胞术的检测结果一致,这些结果与 *rafX* 基因参与磷壁酸的合成相吻合,提示 SPD_0379 蛋白通过调控 *rafX* 基因表达而影响细菌磷壁酸的合成。

生长曲线显示,D39 Δ *spd_0379* 缺陷菌的生长速率较野生菌迟缓,且几乎没有平台期,到达最高菌密度后即快速自溶。有研究表明,*S.pn* 自溶酶 LytA 通过锚定在磷壁酸表面胆碱结合位点发挥水解酶活性^[13]。正常生长状态下的细菌,LytA 锚定至不成熟的 WTA-PG 前体上,并不表现出酶活性;当细菌进入平台期,新合成的 WTA-PG 前体减少,LytA 开始锚定至成熟细胞壁的 WTA,发挥肽聚糖水解酶活性,导致细菌自溶产生^[14]。因此,从理论上讲,当细菌的磷壁酸过多增加时,可能导致会导致 LytA 更早地锚定至成熟细胞壁的 WTA,启动细菌自溶,这可能就是 D39 Δ *spd_0379* 缺陷菌自溶提前的主要原因。

目前已知在致病菌株中,MarR 家族蛋白可通过调节毒力相关因子的表达影响细菌的致病过程。如菊欧文菌 *Dickeya dadantii* 3937 的 MarR 家族蛋白 SlyA 可与 III 型分泌系统的主要调控子 HrpL 一起调节该系统基因的表达,影响细菌的毒力^[15]。*S.pn* 中报道有一个 MarR 家族蛋白 AdcR,为 Zn 离子激活的转录抑制因子,调控 *adcR*、*adcCBA* 等 ABC 转运子的表达,参与细菌的多药耐药^[16]。但尚未见有 MarR 蛋白调控细菌磷壁酸的报道。

通过本研究鉴定了 MarR 家族蛋白 SPD_0379 蛋白对 *rafX* 基因表达的负调控作用,明确了该蛋白对细菌磷壁酸的调控作用,为揭示磷壁酸生物合成通路中的调控机制提供了重要的实验依据,有助于在此基础上研发治疗或预防 *S.pn* 感染的新手段。

参 考 文 献

- [1] O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates[J]. Lancet, 2009, 374(9693): 893–902.
- [2] Weidenmaier C, Peschel A. Teichoic acids and related cell-wall gly-

copolymers in Gram-positive physiology and host interactions[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(4): 276–287.

[3] Perera IC, Grove A. Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators[J]. J Mol Cell Biol, 2010, 2(5): 243–254.

[4] Wu K, Huang J, Zhang Y, et al. A novel protein RafX is important for common cell wall polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*: implications for bacterial virulence[J]. J Bacteriol, 2014, 196(18): 3324–3334.

[5] Doran KS, Engelson EJ, Khosravi A, et al. Blood-brain barrier invasion by group B *Streptococcus* depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid[J]. J Clin Invest, 2005, 115(9): 2499–2507.

[6] Rajagopal M, Walker S. Envelope structures of Gram-positive bacteria[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2017, 404: 1–44.

[7] Denapate D, Brückner R, Hakenbeck R, et al. Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: lessons from genomes[J]. Microb Drug Resist, 2012, 18(3): 344–358.

[8] Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, et al. Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(6): 1266–1269.

[9] Gisch N, Kohler T, Ulmer AJ, et al. Structural Reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency[J]. J Biol Chem, 2013, 288(22): 15654–15667.

[10] Bui NK, Eberhardt A, Vollmer D, et al. Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*[J]. Anal Biochem, 2012, 421(2): 657–666.

[11] Cundell DR, Gerard NP, Gerard G, et al. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor[J]. Nature, 1995, 377(6548): 435–438.

[12] Heß N, Waldow F, Kohler TP, et al. Lipoteichoic acid deficiency permits normal growth but impairs virulence of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 2093.

[13] Severin A, Horne D, Tomasz A. Autolysis and cell wall degradation in a choline-independent strain of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Microb Drug Resist, 1997, 3(4): 391–400.

[14] Mellroth P, Daniels R, Eberhardt A, et al. LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan[J]. J Bio Chem, 2012, 287(14): 11018–11029.

[15] Zou L, Zeng Q, Lin H, et al. SlyA regulates type iii secretion system(T3SS) genes in parallel with the T3SS master regulator HrpL in *Dickeya dadantii* 3937[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(8): 2888–2895.

[16] Guerra AJ, Dann CE, Giedroc DP. Crystal structure of the zinc-dependent MarR family transcriptional regulator AdcR in the Zn(II)-bound state[J]. J Am Chem Soc, 2011, 133(49): 19614–19617.

(责任编辑:冉明会)