

## 论著

文章编号:1000-5404(2014)14-1486-06

### 肺炎链球菌 SpxB 蛋白的细胞表达定位、保守性分析及其生物学功能初探

王哲,王建敏,马峰,张帅,黄远帅,张雪梅 (400016 重庆,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)

**[摘要]** **目的** 鉴定肺炎链球菌中 *spxB* 基因编码蛋白的丙酮酸氧化酶活性、细胞表达定位和保守性表达,并初步研究该基因对细菌毒力影响的部分机制。**方法** 利用 PCR 方法扩增肺炎链球菌 D39 菌株的 *spxB* 基因全长序列,并将其整合至表达载体 pET-28a(+),经测序鉴定后,将重组质粒转化至大肠埃希菌 BL21(DE3),以 IPTG 诱导表达含有 His 标签的 rSpxB 蛋白,经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化后,使用 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度,采用一种商品丙酮酸氧化酶活性质控方法鉴定其酶活性。以 rSpxB 蛋白免疫昆明小鼠获得其多克隆抗体。采用 ELISA 检测多克隆抗体效价,采用 Western blot 鉴定抗体的特异性和蛋白的保守性表达。采用流式细胞术鉴定 *spxB* 的细胞表达定位。构建 *spxB* 缺陷菌,通过与流感嗜血杆菌进行共同培养初步探索其毒力机制。**结果** 实现了具有丙酮酸氧化酶活性 SpxB 蛋白的可溶性表达,该蛋白免疫小鼠后获得高效价特异的抗 SpxB 蛋白抗血清,Western blot 鉴定显示 SpxB 蛋白在 1、2、4、6B、14、19F 和 23F 等血清型肺炎链球菌均有表达,流式细胞术检测显示 SpxB 蛋白的荧光信号较阴性对照有右移,但较阳性对照的荧光信号弱很多。野生菌株 D39 产生的过氧化氢显著高于 *spxB* 缺陷菌,D39 菌株对流感嗜血杆菌的生长抑制作用显著强于 *spxB* 缺陷菌。**结论** 肺炎链球菌 *spxB* 基因编码的蛋白具有丙酮酸氧化酶活性,在肺炎链球菌中有保守表达,且主要表达于细胞内。该蛋白有助于肺炎链球菌与流感嗜血杆菌共生时的优势生长。

**[关键词]** 肺炎链球菌;丙酮酸氧化酶;细胞表达定位;保守性

**[中图分类号]** R372;R378.12;R394-33

**[文献标志码]** A

### Protein expression localization, conservation analysis and biological functions of SpxB in *Streptococcus pneumoniae*

Wang Zhe, Wang Jianmin, Ma Feng, Zhang Shuai, Huang Yuanshuai, Zhang Xuemei (Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the enzyme activity and protein expression localization of pyruvate oxidase encoded by *spxB* gene from *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn*), its conservation in different serotypes of *S. pn*, and its virulence mechanisms. **Methods** The full-length *spxB* gene of *S. pn* D39 was amplified by PCR with specific primers, and then inserted into pET-28a(+). Recombinant plasmid pET-28a(+)-*spxB* was transferred to *E. coli* BL21(DE3) and then the positive clones were induced with IPTG to express His-tagged rSpxB recombinant protein. The recombinant protein was purified by affinity chromatography column, and the protein purity was checked by SDS-PAGE. The enzyme activity assay was performed in a commercial pyruvate oxidase quality control method. The KM mice were immunized with the purified rSpxB protein to obtain polyclonal antibody. The antibody titers were determined by ELISA, and the antibody specificity and protein conservation were determined by Western blotting. The antibody was used for protein expression localization of SpxB in *S. pn* by flow cytometry. The virulence mechanism was studied preliminarily through the construction of *spxB*-deficient mutant strain and co-culture with *Haemophilus influenzae*. **Results** Soluble expression of SpxB with pyruvate oxidase activity was realized. Antiserum of high titer against SpxB protein was obtained from KM mice. Western blotting showed high antiserum specificity to SpxB and the conservation of *spxB* in the 1, 2, 4, 6B, 14, 19F, and 23F serotypes of *S. pn*. Flow cytometry results showed that the fluorescence signal of SpxB

**[基金项目]** 重庆市自然科学基金(CSTC 2001BB5137)

**[通信作者]** 张雪梅,电话:(023)68485216,E-mail: apoe@163.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140710.0926.010.html>(2014-07-10)

shifted to the right compared to the negative control, but much weaker than that of the positive control. The wild D39 strain which produced hydrogen peroxide inhibited the growth of *Haemophilus influenzae*, while the *SpxB*-deficient strains showed much weaker activity. **Conclusion** Pyruvate oxidase encoded by *SpxB* is highly conserved in 7 different serotypes of *S. pn* and has mostly intracellular expression. *SpxB* helps *S. pn* hold advantages to *Haemophilus influenzae* in co-culture.

[Key words] *Streptococcus pneumoniae*; pyruvate oxidase; protein expression localization; conservation

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC 2011BB5137). Corresponding author: Zhang Xuemei, Tel: 86-23-68485216, E-mail: apoe@163.com

肺炎链球菌是一种导致严重感染和社区获得性感染的主要病原菌,可导致中耳炎、鼻窦炎、菌血症、肺炎和脑膜炎<sup>[1]</sup>。世界卫生组织估计在全球范围内,每年有160万人死于肺炎链球菌引起的感染<sup>[2]</sup>。然而肺炎链球菌的致病机制仍不十分清楚,毒力因子研究一直是该领域的研究热点和重点。

丙酮酸氧化酶是一种将丙酮酸分解为乙酰磷酸、 $H_2O_2$ 和 $CO_2$ 的酶,近年来的研究显示,丙酮酸氧化酶的这种产 $H_2O_2$ 的能力影响细菌的致病,是一种新的毒力因子<sup>[3]</sup>。目前发现,肺炎链球菌中只有一种丙酮酸氧化酶,由*spxB*基因编码。研究显示*spxB*基因产物丙酮酸氧化酶在肺炎链球菌生长的稳定期释放的 $H_2O_2$ 导致细菌自溶。并有利于其在鼻咽部的定植<sup>[4]</sup>。另有研究还显示*SpxB*蛋白影响肺炎链球菌的转化<sup>[5]</sup>,而转化不仅影响细菌的毒力而且在细菌的遗传变异中发挥了重要作用<sup>[6]</sup>。但目前尚不清楚*spxB*蛋白的基本表达情况,如细胞表达定位、是否在肺炎链球菌中有保守表达等,以及其在细菌转化及毒力发挥功能的详细机制。

因此,本研究拟对肺炎链球菌*spxB*基因编码的产物进行可溶性表达和纯化,并通过体外检测方法鉴定其丙酮酸氧化酶活性;自制的特异性较高的*spxB*蛋白多克隆抗体,鉴定其在各型肺炎链球菌中的保守性及细胞表达定位,并通过构建*spxB*缺陷菌对其细菌毒力影响的机制进行了初步研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

6~8周龄雌性昆明小鼠7只,体质量(18±2)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 质粒、菌株和试剂

原核表达质粒pET-28a(+),大肠埃希菌DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)感受态为本课题组保存;肺炎链球菌NCTC7466(D39,2型血清型)菌株购于英国典型菌种保藏中心(NCTC)、TIGR4(4型血清型)菌株购于美国典型微生物菌种保藏中心(ATCC)、CMCC(B)31109(1型血清型)、CMCC(B)31207(6B

血清型)、CMCC(B)31614(14血清型)、CMCC(B)31693(19F血清型)、CMCC(B)31759(23F血清型)菌株购于中国医学细菌保藏管理中心(CMCC)。流感嗜血杆菌标准菌株ATCC49247为重庆医科大学儿童医院临床检验科提供。培养基为C+Y半合成培养基以及脑心浸出热肉汤培养基(BHI)。

基因组DNA提取试剂盒(天根);质粒提取试剂盒(Omega);DNA片段纯化试剂盒(Roche);限制性内切酶EcoR I、Xho I、PrimeStar高保真DNA聚合酶和DNA marker DL2 000(TaKaRa);T<sub>4</sub>连接酶(Promega);异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)(Sigma);HRP标记羊抗鼠IgG(中衫金桥);Ni-NTA亲和层析柱(Novagen);丙酮酸氧化酶T45(ASAHI KASEI);2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS;Sigma);辣根过氧化物酶(Sigma);引物合成及测序(北京华大)。

### 1.3 目的基因*spxB*的PCR扩增

*S. pn*菌株D39在C+Y培养基生长至对数生长期,按照试剂盒说明书提取细菌基因组DNA,用于扩增*spxB*基因片段。由GenBank中*S. pn*D39*spxB*基因序列(1776bp),使用Primer Premier 5.0软件设计引物:P1:5'-CCGGAATTCATGACTCAA-GGGAAAATTACTGCAT-3',含EcoR I酶切位点;P2:5'-CCGCT-CGAGTTATTTAATTGCGCGTGATTGCAAT-3',含Xho I酶切位点。引物由北京六合华大基因科技公司合成。PCR扩增体系为50  $\mu$ L:5 $\times$ buffer(含 $Mg^{2+}$ )10.0  $\mu$ L, dNTP(10 mmol/L)4.0  $\mu$ L, P1(10 pmol/L)1.0  $\mu$ L, P2(10 pmol/L)1.0  $\mu$ L, *S. pn*D39基因组DNA1.0  $\mu$ L, PrimeStar 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 32.5  $\mu$ L。按以下条件进行PCR扩增:98  $^{\circ}C$  10 s, 58  $^{\circ}C$  15 s, 72  $^{\circ}C$  2 min、反应30个循环后72  $^{\circ}C$ 延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后,用DNA纯化试剂盒纯化,保存于-20  $^{\circ}C$ 。

### 1.4 构建pET-28a(+)-*spxB*重组质粒

纯化产物*spxB*片段与表达载体pET-28a(+)分别经EcoR I和Xho I限制性内切酶双酶切后,使用T<sub>4</sub>DNA连接酶进行体外连接,之后转化至感受态细胞DH5 $\alpha$ 中,在50  $\mu$ g/mL的卡那霉素抗性(Kan<sup>+</sup>)LB平板上挑取菌落PCR及双酶切鉴定均为阳性的克隆送华大基因测序鉴定。

### 1.5 重组*spxB*蛋白的表达和纯化

将测序正确的重组质粒pET-28a(+)-*spxB*转化到BL21(DE3)感受态细胞中,单个菌落接种至LB培养基(含有50  $\mu$ g/mL卡那霉素)中,37  $^{\circ}C$ 振荡培养过夜,再将培养液按1:50接种至含有50  $\mu$ g/mL卡那霉素的LB培养液中,振荡培养至 $D(600)=0.4\sim 0.5$ 时加IPTG使其终浓度为0.2 mmol/L,

20 °C 诱导培养 8 h。离心收集诱导菌,使用结合缓冲液(500 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,pH = 8.0)重悬菌体沉淀,超声破菌后低温离心 20 min,收集上清液,经 0.22 μm 滤膜过滤后加入 Ni-NTA 亲和层析柱,依次使用 10、20、40、50、60、80 mmol/L 咪唑浓度的洗涤缓冲液洗涤,最后用洗脱缓冲液(500 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L 咪唑,pH = 8.0)进行目的蛋白的洗脱。收集洗脱蛋白,用 SDS-PAGE 分析纯化情况然后用 PBS 超滤除盐,Bradford 法测蛋白浓度。

### 1.6 检测纯化表达的 *spxB* 丙酮酸氧化酶活性

使用 ASAHI KASEI 公司商品化丙酮酸氧化酶 T-45 酶活性的质控方法进行 SpxB 丙酮酸氧化酶活性的检测。将反应混合液 I、底物液和反应混合液 II 按照 6:1:3 混合,精确吸取 1.0 mL 到大 EP 管中,预孵育 37 °C。5 min 后,加入 20 μL 酶溶液(包含 2.5 ng T-45 或纯化表达的 13.4 ng SpxB 蛋白,阴性对照为表达纯化的 SpxB 42 °C 热激 15 min,空白对照只含酶缓冲液),混合后开始在 37 °C 孵育,开始反应。反应开始后 10 min,加 2.0 mL 终止液来终止反应。5 min 后,测量 565 nm 处吸光度值。每次实验做 3 个平行孔并重复 2 次。

### 1.7 制备 *spxB* 蛋白多克隆抗体

取昆明小鼠 7 只,免疫前取尾静脉血作为阴性对照血清。初次免疫时将纯化获得的 SpxB 蛋白与弗氏完全佐剂等量乳化后,实验当天 0 d 腹腔注射免疫昆明小鼠,每只小鼠蛋白抗原用量为 200 μg。初次免疫后第 3、21 天分别以减半剂量的 SpxB 蛋白抗原加弗氏不完全佐剂腹腔加强免疫 2 次,第 3 次免疫后 7 d 摘除昆明小鼠眼球,分离小鼠血清,-20 °C 保存。

### 1.8 ELISA 检测抗 *spxB* 多克隆抗体效价

纯化后的 SpxB 蛋白使用抗原包被液稀释至 5 μg/mL,每孔 200 μL 包被 96 孔板,4 °C 过夜;封闭 2 h 后分别加入 100 μL 从 1:10 000 开始倍比稀释抗血清,以免疫前的昆明小鼠血清为阴性对照,37 °C 孵育 1 h;洗板后加入 1:5 000 稀释的 HRP 酶标羊抗鼠 IgG,37 °C 孵育 1 h;TMB 显色 15 min 后酶标仪测定 D(450)值,以 2.1 倍于阴性对照血清吸光度值的抗体最高稀释倍数作为抗体的效价。

### 1.9 Western blot 检测 SpxB 蛋白在不同血清型 *S. pn* 中的保守性

将 7 种不同血清型的 *S. pn* 在 C + Y 中增菌至对数生长期[D(600) = 0.5 左右],各取 2 mL 菌液离心后沉淀用 PBS 洗涤,1 × 上样缓冲液重悬后煮沸 10 min 裂解细菌。全菌裂解物经 SDS-PAGE 电泳分离后转膜。使用获得的抗 SpxB 多克隆抗体为一抗(1:1 000),羊抗鼠 HRP-IgG 为酶标二抗(1:5 000),化学发光检测。

### 1.10 SpxB 蛋白的细胞表达定位

*S. pn* R6(*S. pn* D39 的无荚膜天然突变株,为本实验室保存)增菌至对数生长期,离心收菌,用预冷的 PBS 洗 2 次后,取 1 × 10<sup>7</sup> CFU 细菌重悬于 100 μL 5% FBS 中,加入 1 μL 抗 SpxB 多克隆抗体(1:1 000 稀释),以抗磷酸盐(TA)抗体作为阳性对照,未免疫小鼠血清为阴性对照,抗 VicK 抗体为半阴性对照,37 °C 孵育 1 h 后,PBS 洗 2 次,加入 PE 标记的羊抗鼠 IgG,4 °C 避光孵育 50 min,PBS 洗 3 次,流式细胞术进行检测。

### 1.11 D39Δ*spxB* 的构建及鉴定

采用长臂同源多聚酶链式反应(LFH-PCR)技术将 *spxB* 基因替换为红霉素耐药基因(erm)后同源重组于肺炎链球菌 D39,在含红霉素(0.25 mg/mL)的血平板上筛选出 *spxB* 缺陷菌株。用 PCR 及 Western Blot 鉴定缺陷菌株。

取对数生长早期等体积 *S. pn* D39 和 D39Δ*spxB* 菌液离心,PBS 洗涤后加入原体积 C + Y 半合成培养基,1.5 mL EP 管内 37 °C 孵育 40 min。180 μL 等量培养液上清加入 96 孔板中,再加入 20 μL 的含有 3 mg/mL 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐,0.2 mg/mL 辣根过氧化物酶的 0.1 mol/L PBS (pH = 7.0)溶液,室温反应 20 min,测 D(560),然与已知浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的标准曲线比较,得出各菌培养液上清中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的产量,按细菌铺板计数结果调整为相对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产量。

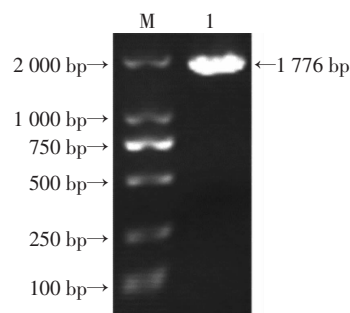
### 1.12 肺炎链球菌与流感嗜血杆菌共培养实验

在添加有 0.03 mg/1 mL 的氯化血红素和 1 mg/mL NAD 的脑心浸出液肉汤培养基 sBHI 中培养肺炎链球菌 D39、D39Δ*spxB* 和流感嗜血杆菌 ATCC49247,长至对数生长早期,收集菌液,离心后冷 HBSS 洗涤,用 BHI 重悬到原始体积,等体积的肺炎链球菌和流感嗜血杆菌混合后,在 96 孔板中,37 °C 孵育 3 h,每小时取各样本,用 HBSS 稀释后,铺板计数,肺炎链球菌铺于 CNA 平板,流感嗜血杆菌铺于 HIN 巧克力平板。阴性对照为流感嗜血杆菌加上等体积的 sBHI。

## 2 结果

### 2.1 目的基因 *spxB* 的 PCR 扩增

PCR 产物 5 μL 置于 1% 琼脂糖凝胶电泳,相对分子质量约 1 800 bp 处有清晰条带,与 *spxB* 全长加酶切位点和保护碱基后大小一致(图 1)。



M:标准;1:*spxB* 基因 PCR 产物

图 1 *spxB* 基因的 PCR 扩增结果

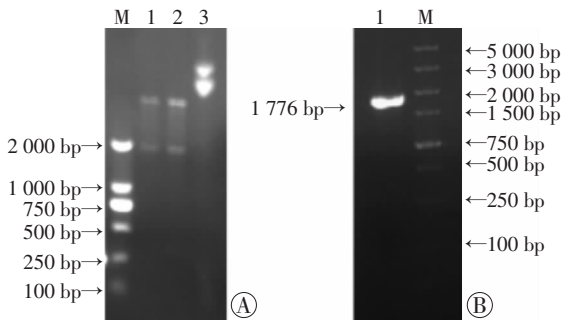
### 2.2 pET-28a(+)-*spxB* 重组质粒的构建与鉴定

*spxB* 基因 PCR 扩增产物与表达载体 pET-28a(+)连接,所得阳性克隆经菌落 PCR 和质粒双酶切鉴定,1% 琼脂糖凝胶电泳出现的条带与目的片段大小一致(图 2)。阳性克隆送往华大基因测序,测序结果 *spxB* 基因片段与 GenBank 公布序列一致,证明重组质粒构建成功。

### 2.3 *spxB* 重组蛋白的诱导表达及纯化

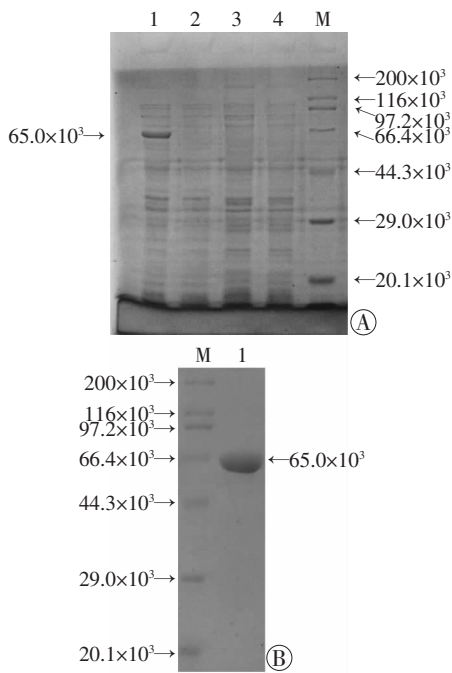
SDS-PAGE 结果显示(图 3),含有重组质粒 pET-28a(+)-*SpxB* 的 *E. coli* BL21(DE3)菌株经 IPTG 诱导后,与转化未诱导菌及空载菌 *E. coli* BL21(DE3)相比,在相对分子质量约 65 ×

10<sup>3</sup>处有一条明显增粗的蛋白条带,与预期的 SpxB 蛋白大小一致。超声破菌后取上清经 Ni-NTA 树脂亲和层析纯化,超滤除盐后经 SDS-PAGE 发现纯化所得 SpxB 蛋白纯度较高,纯度达 90% 以上,可用于免疫等后续实验。



A: 双酶切鉴定; B: PCR 鉴定 M: 标准; 1、2: pET-28a(+) -*spxB* 经 *Eco*I 及 *Xho*I 的双酶切产物; 3: pET-28a(+) 经 *Eco*I 及 *Xho*I 的双酶切产物; 4: 质粒 pET-28a(+) -*spxB* 的 PCR 产物

图2 重组质粒 pET-28a(+) -*spxB* 的 PCR 及双酶切鉴定



A: 重组 SpxB 蛋白的诱导表达 M: 标准; 1: 诱导 pET-28a(+) -*spxB* 重组菌株; 2: 未诱导 pET-28a(+) -*spxB* 重组菌株; 3: 诱导 pET-28a(+) 空载菌株; 4: 未诱导 pET-28a(+) 空载菌株; B: 纯化后 SpxB 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定 M: 标准; 1: 纯化的重组蛋白 SpxB

图3 重组蛋白 *spxB* 的表达及纯化

## 2.4 纯化表达的 SpxB 丙酮酸氧化酶活性的检测

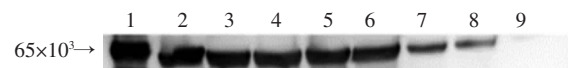
按照 T-45 (ASAHI KASEI) 商品丙酮酸氧化酶质控方法测得 565 nm 读数显示, T-45 丙酮酸氧化酶读数在 0.60 以上, 表达纯化的 SpxB 读数不足 0.30, 但均高于热激失活 SpxB 和空白对照, 提示表达纯化的 SpxB 蛋白具有丙酮酸氧化酶活性, 而 42 °C 热激 15 min 后的 SpxB 蛋白与不含酶的空白对照近似, 即丧失了酶活性。该结果提示所获得的重组 SpxB 蛋白具有丙酮酸氧化酶活性。

## 2.5 抗 SpxB 多克隆抗体效价

重组 SpxB 蛋白免疫昆明小鼠后, 分离血清制备抗 SpxB 多克隆抗体, 经 ELISA 法检测, 抗体 IgG 效价可达 1:2 560 000 以上, 说明重组 *spxB* 蛋白与佐剂混合免疫 3 次即可刺激小鼠产生高滴度的抗体。

## 2.6 抗 SpxB 多克隆抗体 Western blot 分析

用 Western blot 对 7 株不同血清型的肺炎链球菌全菌裂解液中 *spxB* 蛋白进行检测, SpxB 重组蛋白作为阳性对照, *E. coli* BL21(DE3) 作为阴性对照。结果显示(图 4), 阳性对照出现一条特异性条带, 相对分子质量约为 65 × 10<sup>3</sup>, 说明该抗血清能特异性识别 SpxB 重组蛋白。同时在多种血清型 *S. pn* 全菌裂解样本中均有一条特异的条带, 大小与 SpxB 重组蛋白一致, 提示 *spxB* 蛋白在 *S. pn* 中保守性较高。



1: 纯化 SpxB 重组蛋白; 2: CMCC 31109 (1 型); 3: D39 (2 型); 4: TIGR4 (4 型); 5: CMCC 31207 (6B 型); 6: CMCC 31614 (14 型); 7: CMCC 31693 (19F 型); 8: CMCC 31759 (23F 型); 9: 阴性对照 *E. coli* BL21

图4 抗 *spxB* 多克隆抗体 Western blot 分析

## 2.7 SpxB 蛋白的细胞表达定位

磷壁酸是肺炎链球菌表面多糖, 本研究将其设为阳性对照, 阴性对照为未免疫小鼠血清, 本实验室前期研究证实 VicK 蛋白为胞外少量表达的蛋白, 本研究将其设为半阴性对照。流式细胞术检测结果显示(图 5), 阳性对照抗磷壁酸抗体染色后荧光强度较阴性对照和抗 VicK 抗体染色明显升高, 而抗 *spxB* 多克隆抗体染色后荧光强度较阴性对照稍高, 与抗 VicK 抗体染色组相近, 显著低于阳性对照组 TA, 已知磷壁酸 (TA) 位于细菌表面, VicK 蛋白主要位于细胞内, 提示 SpxB 蛋白主要在胞内表达。

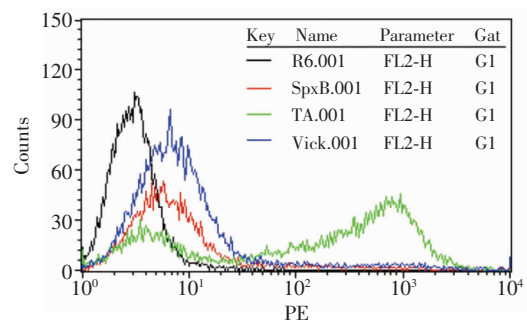


图5 流式细胞术检测 SpxB 蛋白的细胞定位

## 2.8 成功构建 D39Δ*spxB*

分别以 D39 和 D39Δ*spxB* 的 DNA 为模板使用 PCR 扩增相应片段, 缺陷菌中红霉素抗性基因 *erm* 替代 *spxB* 基因, 在 1 776 bp 处无 *spxB* 片段, 在 859 bp 处可见 *erm* 片段, 野生菌中在 1 776 bp 处有 *spxB* 片段, 在 859 bp 处无 *erm* 片段。用 P1、P4 扩增野生菌株和缺陷菌株, 分别在约 3 134 bp 和 2 217 bp 处有目的片段(图 6)。

使用自制的抗 SpxB 多克隆抗体对野生菌 D39 和缺陷菌 D39Δ*spxB* 的全菌裂解液进行 Western blot 分析, 可见缺陷菌 SpxB 蛋白位置无条带(图 7)。

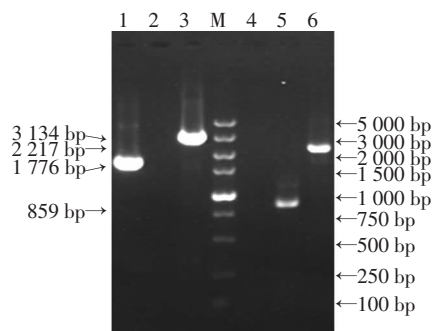


图6 *spxB* 缺陷菌株的 PCR 鉴定结果  
M: 标准;1,2,3: 以野生菌 DNA 为模板分别扩 *spxB* (1776 bp), *erm* (859 bp), *up-spxB-dw* (3134 bp); 4,5,6: 以 *spxB* 缺陷菌 DNA 为模板分别扩 *spxB* (1776 bp), *erm* (859 bp), *up-erm-dw* (2217 bp)

图6 *spxB* 缺陷菌株的 PCR 鉴定结果

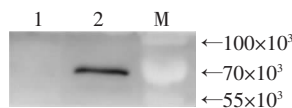


图7 *spxB* 缺陷菌株的 Western blot 鉴定结果  
M: 标准;1: D39 $\Delta$ *spxB* 全菌裂解液; 2: D39 全菌裂解液

图7 *spxB* 缺陷菌株的 Western blot 鉴定结果

通过对过氧化氢的相对产量进行检测发现,缺陷菌 D39 $\Delta$ *spxB* 的相对产量为  $1.4 \times 10^{-9}$  mmol/(L·CFU),远低于野生菌 D39 的相对产量 [ $1.36 \times 10^8$  mmol/(L·CFU)]。以上结果证实缺陷菌 D39 $\Delta$ *spxB* 构建成功。

## 2.9 肺炎链球菌与流感嗜血杆菌共培养

在共培养条件下,相同起始菌量的流感嗜血杆菌与野生菌 D39 共培养 3 h 后菌量为  $4.87 \times 10^8$  CFU/mL,明显低于与缺陷菌 D39 $\Delta$ *spxB* 共培养的菌量  $6.42 \times 10^8$  CFU/mL 及只含有流感嗜血杆菌组的菌量  $6.88 \times 10^8$  CFU/mL。该结果显示,野生菌 D39 对流感嗜血杆菌的生长有一定的抑制作用,而缺陷菌 D39 $\Delta$ *spxB* 对流感嗜血杆菌没有抑制作用,表明 *SpxB* 蛋白缺失后,D39 菌株失去了抑制流感嗜血杆菌生长的能力,提示 *SpxB* 有助于肺炎链球菌与其他菌株的竞争。

## 3 讨论

在本课题组前期研究中在肺炎链球菌中通过免疫共沉淀和质谱分析筛选到丙酮酸氧化酶 *SpxB* 与两种类型的热休克蛋白 (ClpE 和 DnaJ) 都有相互作用<sup>[7-8]</sup>,而这两种热休克都是肺炎链球菌的重要毒力因子。为了深入探索可能的毒力调控机制,我们拟先对 *SpxB* 蛋白功能进行详细分析。

由于在之前关于丙酮酸氧化酶 *SpxB* 的文献中未见具体检测其酶活性的方法,也没有相应的商品化丙酮酸氧化酶酶活性检测试剂盒,本研究利用试剂公司标准品丙酮酸氧化酶质控方法测定酶活性。该方法原理是有氧条件下丙酮酸和氧气以及磷酸在丙酮酸氧化酶催化下生成乙酰磷酸、二氧化碳和过氧化氢,生成的过氧化氢与 4-氨基安替比林、N,N-二甲基苯胺在酸性条件下被过氧化氢酶催化生成水和 565 nm 波长特异

性检测物质苯醌二亚胺,通过检测该有色物质的量确定生成过氧化氢的量从而计算参与催化反应的丙酮酸氧化酶的活性。通过该方法,我们明确鉴定出所表达的重组 *SpxB* 蛋白具有丙酮酸氧化酶活性,验证了肺炎链球菌 *SpxB* 蛋白的生物学功能。

全基因组测序结果显示 *spxB* 基因在肺炎链球菌中较为保守,但在 *SpxB* 蛋白水平上的保守性尚无直接证据。本研究验证了 *SpxB* 蛋白在国内常见血清型 1、2、4、6B、14、19F 和 23F 菌株<sup>[9]</sup> 中均有较高水平的表达,提示肺炎链球菌中的 *SpxB* 蛋白高度保守,可能具有重要作用。

近年来,肺炎链球菌丙酮酸氧化酶 *SpxB* 开始作为毒力因子被关注。*spxB* 基因缺陷的肺炎链球菌表现出粘附和毒力的下降<sup>[3]</sup>,并对  $H_2O_2$  耐受性降低<sup>[10]</sup>。*spxB* 分解丙酮酸产生的乙酰磷酸也是肺炎链球菌有氧条件和氧化应激条件下 ATP 的重要来源<sup>[10]</sup>。文献<sup>[11-13]</sup>报道,肺炎链球菌产生的  $H_2O_2$  可通过抑制 FabF 来改变膜脂肪酸的组成;还可以抑制甚至杀死其他与肺炎链球菌共同存在于上呼吸道的细菌比如流感嗜血杆菌和金黄色葡萄球菌。*SpxB* 是肺炎链球菌中目前已知的产生  $H_2O_2$  的酶,因此我们构建了其缺陷菌进行研究。我们的研究显示该基因缺陷后,细菌的  $H_2O_2$  产量显著下降,对流感嗜血杆菌的抑制作用消失,和国外对同型肺炎链球菌的研究结果一致,提示 *spxB* 的确可通过产生  $H_2O_2$  而使肺炎链球菌在一定的微生态环境中占据优势。

本研究利用分子克隆技术,成功表达并纯化出有酶活性的 *SpxB* 蛋白,获得了高滴度高特异性多克隆抗体,证实该蛋白在不同血清型肺炎链球菌中保守存在,并验证了 *SpxB* 蛋白主要存在于胞内,通过产生  $H_2O_2$  帮助肺炎链球菌抑制其他细菌,这些研究结果为为进一步研究该蛋白的生物学功能及对细菌毒力影响的作用机制奠定了坚实的基础。

## 参考文献:

- [1] Domenech-de-Celles M, Opatowski L, Salomon J, et al. Intrinsic epidemicity of *Streptococcus pneumoniae* depends on strain serotype and antibiotic susceptibility pattern [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(11): 5255-5261.
- [2] Levine O S, O'Brien K L, Knoll M, et al. Pneumococcal vaccination in developing countries [J]. *Lancet*, 2006, 367(9526): 1880-1882.
- [3] Spellerberg B, Cundell D R, Sandros J, et al. Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Mol Microbiol*, 1996, 19(4): 803-813.
- [4] Regev-Yochay G, Trzcinski K, Thompson C M, et al. *spxB* is a suicide gene of *Streptococcus pneumoniae* and confers a selective advantage in an *in vivo* competitive colonization model [J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(18): 6532-6539.

[5] Battig P, Muhlemann K. Influence of the *spxB* gene on competence in *Streptococcus pneumoniae*[J]. J Bacteriol, 2008, 190(4): 1184-1189.

[6] Johnston C, Martin B, Granadel C, et al. Programmed protection of foreign DNA from restriction allows pathogenicity island exchange during pneumococcal transformation[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(2): e1003178.

[7] Cai Y, Yan W, Xu W, et al. Screening and identification of DnaJ interaction proteins in *Streptococcus pneumoniae* [J]. Curr Microbiol, 2013, 67(6): 732-741.

[8] Yan W, Cai Y, Zhang Q, et al. Screening and identification of ClpE interaction proteins in *Streptococcus pneumoniae* by a bacterial two-hybrid system and co-immunoprecipitation[J]. J Microbiol, 2013, 51(4): 453-460.

[9] Liu Y, Wang H, Chen M, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in China younger than 5 years[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008, 61(3): 256-263.

[10] Pericone C D, Park S, Imlay J A, et al. Factors contributing to

hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (*spxB*) and avoidance of the toxic effects of the fenton reaction [J]. J Bacteriol, 2003, 185(23): 6815-6825.

[11] Benisty R, Cohen A Y, Feldman A, et al. Endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by *Streptococcus pneumoniae* controls FabF activity [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801(9): 1098-1104.

[12] Pericone C D, Overweg K, Hermans P W, et al. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract[J]. Infect Immun, 2000, 68(7): 3990-3997.

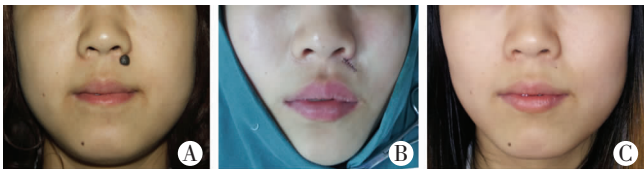
[13] Regev-Yochay G, Trzcinski K, Thompson C M, et al. Interference between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: In vitro hydrogen peroxide-mediated killing by *Streptococcus pneumoniae*[J]. J Bacteriol, 2006, 188(13): 4996-5001.

(收稿:2013-12-01;修回:2014-02-28)

(编辑 邓强庭)

(上接 1485 页)

伤口隐藏在鼻翼沟内,瘢痕为剝除周长的 1/2,3 个月后随访瘢痕不明显。



A: 术前; B: 术中剝除后直接缝合无“猫耳”; C: 术后 1 年

图 1 上唇色素痣患者手术前后观察



A: 术前; B: 术中剝除后直接缝合无“猫耳”; C: 术后 3 个月

图 2 鼻翼旁色素痣患者手术前后观察

### 3 讨论

面部最常见的皮肤良性肿物为皮肤色素痣,一般来说恶变率很低,但影响外观及人际交往,患者出于美观需要往往有去除的要求。目前去除色素痣方法主要有外科手术、物理疗法、化学疗法,通过手术、激光去除色素痣是主流方法,而直径大于 3mm 的色素痣主要采用手术剝除。传统梭形组织切除会遗留大约皮损宽度 3 倍以上的瘢痕。很多患者对这一结果难以接受。日本学者难波雄哉<sup>[2]</sup>1996 年提出痣剝除后无须缝合,术后创面通过自然收缩形成瘢痕愈合,效果良好,但愈合时间长,遗留瘢痕较大。痣剝除后行环形伤口荷包缝合,可缩短创面愈合时间<sup>[3-4]</sup>,但该方法愈合后难免出现凹凸不平的情况。Hudson-Peacock 等<sup>[5]</sup>对 51 例皮肤恶性肿瘤切除后缝合进行研究,指出其中有 14 例(28%)可直接缝合无需修剪“猫耳”,分别位于头颈部、躯干和四肢。Seo 等<sup>[6]</sup>在 41 例患者体表肿物切除的研究中指出圆形剝除再修剪“猫耳”比梭形切除皮损平均切口长度短 14%,在躯干、头皮等皮肤较厚的部位切口缩短尤其明显,有 12% 的患者无需修剪“猫耳”。以上述经验为基础,

我们发现鼻周组织较致密,变形小,可直接剝除后缝合,所得瘢痕长度为皮损剝除周长的 1/2,按圆形来计算即为直径的  $\pi/2$  (约 1.57 倍),大大缩短了遗留瘢痕。

运用直接剝除法,痣直径在 2~3 mm 者单纯剝除后创面约需 10 d 愈合,直径 7 mm 者约需 15 d,直径 10 mm 者需 3~4 周<sup>[2]</sup>。相比于切缝法,创面愈合时间明显延长;而传统梭形切除缝合法会导致切口瘢痕过长,通过实践我们发现鼻周组织的特点,可以直接剝除缝合缩短瘢痕,获得更好的术后效果。避免了创面暴露自行愈合的长时间,也避免了荷包缝合早期出现放射状排列的皱褶畸形<sup>[3]</sup>,愈合后瘢痕较传统切缝法明显变短。

痣剝除缝合术要点主要包括:①部位选择:只能是鼻头、鼻翼、鼻周组织 1.5~2 cm 范围内色素痣,仅发现该部位可剝除后直接缝合而不产生明显“猫耳”。②切缝方法:痣剝除要深及皮肤全层,直至脂肪层,使痣细胞完全剝除,切缘皮下充分游离,减张要确切,减少术后瘢痕增生。

目前仅发现鼻周组织有此特性,其他部位软组织是否有此特性还有待进一步研究。

### 参考文献:

[1] 李青峰,顾玉东,关文祥. 皮损的纵横双向分次切除法[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1993, 9(6): 435-437.

[2] 难波雄哉. 无需缝合的黑痣切除术[J]. 实用美容整形外科杂志, 1996, 7(4): 169-171.

[3] 林遐,展望. 痣剝除真皮内荷包缝合术疗效分析[J]. 中国美容医学, 2012, 21(7): 1117-1118.

[4] Cohen P R, Martinelli P T, Schulze K E, et al. The purse-string suture revisited; a useful technique for the closure of cutaneous surgical wounds[J]. Int J Dermatol, 2007, 46(4): 341-347.

[5] Hudson-Peacock M J, Lawrence C M. Comparison of wound closure by means dog ear repair and elliptical excision[J]. J Am Acad Dermatol, 1995, 32(4): 627-630.

[6] Seo S H, Son S W, Kim I H. Round excisions lead to shorter scars and better scar positioning than traditional elliptical excisions[J]. Dermatology, 2008, 217(3): 276-280.

(收稿:2014-03-25;修回:2014-04-28)

(编辑 王小寒)