

# 用绿色荧光蛋白研究军团菌与寄主的相互关系\*

黄绍松 徐润林 陆勇军\*\*

(中山大学生命科学院 广州 510275)

**摘要:** 原生动物作为军团菌的天然寄主, 在军团菌的生存、增殖、毒力和抗逆性等方面起着重要的作用。通过多次转化筛选, 获得了一种高量表达绿色荧光蛋白基因 *gfpmut2* 的自发突变质粒。该质粒在嗜肺军团菌细胞内稳定复制和表达; 转化了该质粒的嗜肺军团菌在自然光下即可发出明亮的绿色荧光。以转化菌饲喂嗜热四膜虫 Bf1 株后, 在荧光显微镜下能清楚观察到细菌在细胞内的形态变化、增殖和裂解宿主细胞的过程。为研究嗜肺军团菌与原生动物寄主的相互关系提供了一种简单而直观的方法。

**关键词:** 绿色荧光蛋白, 嗜肺军团菌, 嗜热四膜虫, 寄主

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0021-04

## Use of Green Fluorescent Protein to Study the Relationship between *Legionella pneumophila* and Its Protozoan Host\*

HUANG Shao-Song XU Run-Lin LU Yong-Jun\*\*

(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275)

**Abstract:** Protozoans, the natural host of the facultative intracellular pathogen *Legionella* species, play an important role in survival, proliferation, virulence and stress resistance of *Legionella* species. By repeating transformation and selection, a spontaneous mutant of plasmid over expressing green fluorescent protein was obtained. This mutant replicates and is maintained stably in *Legionella* cells. The colonies of *L. pneumophila* harbouring the mutated plasmid were intense green in colour even under the daylight. After feeding Bf1 strain of *Tetrahymena thermophila* with transformed *L. pneumophila*, the intracellular dynamic of changing of bacterial shape, bacterial proliferation and lysis of the host cell due to the bacterial proliferation were observed clearly under fluorescent microscopy. Thus, the present paper provides a simple and intuitionistic strategy for investigating the ecological and cellular relationship between *L. pneumophila* and its host.

**Key words:** Green fluorescent protein, *Legionella pneumophila*, *Tetrahymena thermophila*, Host

军团菌 (*Legionella*) 是军团菌病的条件性病原菌, 广泛生活在河流、土壤和人工水系统如冷却塔水等淡水环境中。多种自由生活的原生动物是军团菌的重要寄主, 在军团菌的生存、增殖、毒力和抗逆性等方面起着重要的作用, 是军团菌在贫营养的自然环境中维持种群的重要因素<sup>[1]</sup>。因此, 原生动物和军团菌的生态关系以及军团菌在原生动物寄主细胞中的增殖机制一直是研究的重点。但是, 虽然军团菌病最常见和最危险的致病菌——嗜肺军团菌 (*L. pneumophila*) 的全基因组序列已经测定完毕, 但是我们对其遗传背景的了解仍然有限, 许多遗传学研究技术仍有待建立, 例如与其胞内

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39900006)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39900006)

\*\* 通讯作者 Tel: 86-20-84111218, E-mail: LUYJ@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2005-05-11, 修回日期: 2005-06-18

增殖机制研究有关的技术。再次, 原生动物的许多生物学特性也给深入研究军团菌与其生态关系带来了困难。例如, 自由生活的原生动物多以生境中的细菌为食, 因此在原生动物细胞内存在各种微生物种类, 这使得确定和区别军团菌与其它细菌变得颇不容易。

绿色荧光蛋白 (GFP) 已在现代生物学研究中得到广泛应用。本文报道了能在嗜肺军团菌细胞内高量表达绿色荧光蛋白的自发突变质粒的筛选, 并描述了利用表达该蛋白的嗜肺军团菌感染嗜热四膜虫的方法, 利用该方法可清楚地观察细菌在寄主细胞中增殖的动态过程, 为研究嗜肺军团菌与寄主 (原生动物和人细胞) 的相互关系提供了方便。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒及培养基

嗜肺军团菌血清 1 型菌株 (*Legionella pneumophila* serogroup I) ATCC33152 广州市疾病预防控制中心惠赠。大肠杆菌菌株 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

质粒 pBC (gfp) Pmip 由 Hacker 博士惠赠, 为氯霉素抗性。

军团菌培养基 BCYEa: 盐酸半胱氨酸 0.4g, 焦磷酸铁 0.25g, 酵母浸出物 10g, 活性炭粉 15g, ACES 10g, 琼脂 20g,  $\alpha$ -酮戊二酸 1g, 蒸馏水定容至 1L。液体培养基 AYE 则不加活性炭和琼脂。

### 1.2 虫株和培养基

嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) BF1 株: 由中国科学院武汉水生生物研究所杨军先生惠赠。

PYG 培养基: 蛋白胨 15g, 酵母浸出物 5g, 无水葡萄糖 1g, 蒸馏水定容至 1,000mL, 自然 pH 值,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15min, 用于四膜虫的培养。PBSS 缓冲液: 2mmol/L KCl, 1mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1mmol/L Tris · Cl, 用 KOH 调 pH 值至 7.0,  $1 \times 10^5$  Pa, 15min 灭菌后室温保存。

### 1.3 军团菌的电激转化

军团菌的电激转化参照 Mintz 等的方法<sup>[2]</sup>。将转化子接入 AYE 中, 37℃ 振荡培养 4h, 然后分小份涂布于含 5 $\mu$ g/mL 氯霉素的 BCYEa 培养基上, 37℃ 培养 4~5d 后挑取表达 GFP 的克隆, 划线接种于含氯霉素 15 $\mu$ g/mL 的 BCYEa 培养基上, 置含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中 37℃ 培养 48h 后, 挑出稳定表达的转化子于 -70℃ 保存待用。

### 1.4 嗜热四膜虫 BF1 株的培养及军团菌的感染

接种 BF1 种子培养液 1mL 至 50mL PYG 中, 于 30℃ 光照培养箱中培养 3d 至饱和, 按 5% 的比例接种于 100mL PYG 培养基中, 30℃ 光照培养 3d 后收集菌体并稀释至  $10^5$  cell/mL。将液体或固体培养基上培养 48h 的军团菌用蒸馏水稀释至  $OD_{600} = 0.10$  (约  $10^8$  cell/mL), 按 25mL/管分装至无菌的 50mL 离心管中培养 1h, 加入适当体积的菌液, 混匀, 置于 30℃ 培养箱中, 2h 后加入 80 $\mu$ g/mL 的硫酸庆大霉素, 相同温度条件下处理 1h 杀死四膜虫细胞外的军团菌; 4,000g 离心 10min, 小心去除上清, 加入 50mL PBSS 缓冲液, 混匀, 把混匀的虫液按 1mL/管分装至 1.5mL 无菌离心管中, 不同时间

直接取样或用 1% 甲醛固定后取样用 OLYMPUS 落射式荧光显微镜蓝光组件观察 BF1 细胞内军团菌的形态及增殖过程。

2 结果与讨论

2.1 多次转化法筛选高量表达绿色荧光蛋白基因 *gfpmut2* 的自发突变质粒

质粒 pBC(*gfp*)Pmip 由 pBC KS + 衍生而来, 在后者的多克隆位点的 *Xba*I 与 *Pst*I 酶切位点之间插入来自质粒 pKEN 的绿色荧光蛋白基因 *gfpmut2*, 该基因上游插入来自于嗜肺军团菌的 JR32 株的感染增强蛋白 (*mip*) 的启动子<sup>[3]</sup> (图 1)。该质粒能在嗜肺军团菌中扩增和表达绿色荧光蛋白, 但是表达量较低, 在选择性培养基上一般只能看到灰白色的菌落, 在荧光显微镜下也只能发出较弱的荧光。为了获得高量表达绿色荧光蛋白的质粒, 我们采用了筛选自发突变质粒的方法。首先将质粒转入大肠杆菌中进行扩增, 然后提取质粒, 再用电激法转入嗜肺军团菌中, 在选择性培养基上挑出深绿色的菌落。经过多轮筛选, 最终获得了几株目标转化子。为了获得稳定表达的突变质粒, 我们从军团菌转化子中提取质粒, 转入大肠杆菌中, 然后再转入军团菌, 挑取深绿色菌落, 提取质粒, 重复以上过程, 直至获得稳定表达的质粒 (图 2)。我们将其中一个突变质粒命名为 pMBC(*gfp*)Pmip。经测序发现, 该质粒在复制起始位点 *RNA II* 基因的启动子区附近发生了一个点突变 (陈定强等, 待发表)。

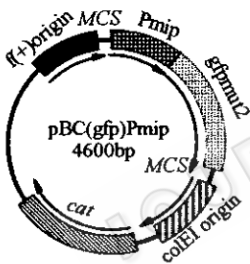
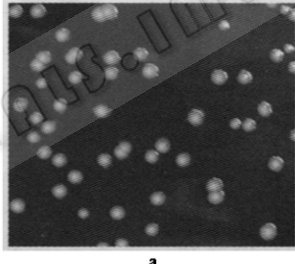
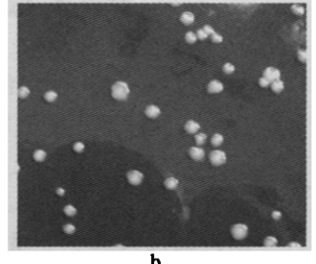


图 1 pBC(*gfp*)Pmip 质粒示意图



a



b

图 2 带有 pBC(*gfp*)Pmip 的嗜肺军团菌和转化高量表达突变质粒 pMBC(*gfp*)Pmip 的转化子的比较

a 带有 pBC(*gfp*)Pmip 的菌落, b 带有 pMBC(*gfp*)Pmip 的菌落

2.2 pMBC(*gfp*)Pmip 质粒在嗜肺军团菌细胞内的表达对细胞生长的影响

与没有转化 pMBC(*gfp*)Pmip 质粒的嗜肺军团菌相比, 转化子不论在细胞形态、生长速度、生物量和稳定期存活能力上都没有显著的差异 (结果未列出), 表明 pMBC-(*gfp*)Pmip 质粒在嗜肺军团菌细胞内的高量表达对细胞基本没有影响。

2.3 嗜肺军团菌在嗜热四膜虫细胞内的增殖和裂解细胞的过程

不同生长时期的嗜肺军团菌在形态上有明显差别, 细胞的这种分化与其感染能力和毒力密切相关<sup>[4]</sup>。本方法不仅可以直观地观察到军团菌的形态变化, 也可以追踪嗜肺军团菌在寄主细胞内的增殖和裂解细胞的动态过程。如图 3 所示, 嗜肺军团菌的感染周期可大致分为成功感染、快速生长繁殖、后期成熟和裂解寄主细胞等四个阶段。嗜热四膜虫吞噬处于对数生长后期的军团菌后, 形成一个吞噬泡, 此时的军团菌呈长丝状, 不运动 (图 3a); 在感染 12h 内, 细菌进入生长繁殖期 (图 3b); 12~24h 是细菌快速增长阶段, 寄生于不同部位的细菌逐渐融合形成一个或少数几个菌团, 但菌团

与寄主细胞内容物之间边界不规则,在蓝光照射时菌团发出不均匀的绿光(图 3c);24h 后进入后期成熟阶段,在此期间细菌数量增长减缓,但菌团形状逐渐变得规则,菌团与寄主内容物之间的边界变得很明显,在荧光显微镜下观察,菌团发出均匀明亮的绿光,军团菌变成短杆状,可清楚见到菌体微微颤动,这是由于寄主细胞内营养即将耗尽而引起的细菌形态上的改变,称为传播期(Transmission)<sup>[4]</sup>(图 3d);感染晚期的四膜虫细胞膜出现崩解,有规则外形的菌团也随之破裂,释放出细菌。细菌缓慢地运动,逐渐扩散开去(图 3e, f),至此军团菌完成了一个生活周期。

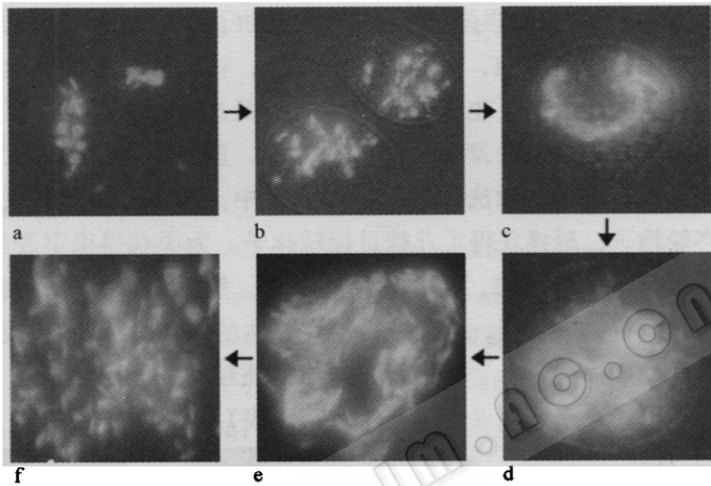


图 3 绿色荧光蛋白指示的嗜肺军团菌感染嗜热四膜虫的过程

a 感染早期, b 繁殖期, c 快速生长期, d 传播期, e 宿主裂解, f 松散的细胞团

### 3 结论

通过筛选自然突变质粒的方法获得一个突变的质粒 pMBC(gfp)Pmip。该质粒可在嗜肺军团菌细胞中高量稳定表达 GFP,同时该菌的其它生物学特征没有可检测到的改变;表达 GFP 的嗜肺军团菌细胞在荧光显微镜下不需经过染色等处理就能直接活体观察,并能直接计算细菌数量;嗜肺军团菌在感染原生动物并在原生动物细胞内生长繁殖过程中表达该蛋白的能力没有减弱,非常有利于跟踪观察嗜肺军团菌感染原生动物以后在细胞内的整个动态变化过程。该系统为广泛深入研究自由生活原生动物与军团菌的生态关系及军团菌胞内增殖等细胞生物学机制提供了一种直观便利的途径。

**致谢** 感谢本实验室硕士生黄汝添在绘图上的帮助。

### 参考文献

- [1] Swanson M S, Hammer B K. Annu Rev Microbiol, 2000, 54: 567 ~ 613.
- [2] Mintz C S. Microb Infect, 1999, 1: 1203 ~ 1209.
- [3] Kohler R, Bubert A, Gorbelt W, et al. Mol Gen Genet, 2000, 262: 1060 ~ 1069.
- [4] Molofsky A B, Swanson M S. Mol Microbiol, 2004, 53 (1): 29 ~ 40.