

## 研究报告

肺炎链球菌 *pcsB* 组成型表达的 *yycF* 缺陷菌株的构建及其致病能力肖云菊<sup>1</sup> 张竞辉<sup>1</sup> 肖胜楠<sup>2</sup> 尹一兵<sup>1</sup> 张雪梅<sup>\*1</sup><sup>1</sup> 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<sup>2</sup> 重庆医科大学附属儿童医院检验科 重庆 400014

**摘要:**【背景】YycFG 双组分系统是肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*)应对外界环境的重要信息传递系统, 其中表达反应调节子 YycF 的编码基因是肺炎链球菌生长的必需基因, 但其是否调控细菌毒力尚不清楚。【目的】构建肺炎链球菌 *pcsB* 组成型表达及 *yycF* 缺陷菌, 分析 YycF 对肺炎链球菌生物学特征和毒力的影响。【方法】采用 Janus cassette (JC)反选的方法构建 *pcsB* 组成型表达菌株(Pc-PcsB<sup>+</sup>), 从该菌株出发用替代失活的方法构建 *yycF* 缺陷菌株(Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF*), 比较野生株 D39*rpsL41*、*pcsB* 组成型表达株及 *yycF* 缺陷株的生长特性、荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)含量、粘附侵袭能力和致病性的差异。【结果】成功构建 *pcsB* 组成型表达的 *yycF* 缺陷菌株(Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF*); *yycF* 缺陷导致细菌生长缓慢、分裂异常、胞内荚膜多糖和小分子荚膜多糖增多; 体外实验结果显示, *yycF* 缺陷菌株粘附能力较 Pc-PcsB<sup>+</sup>菌株减弱( $P=0.006$ )。体内毒力实验显示, 感染野生菌的小鼠全部死亡, 感染 Pc-PcsB<sup>+</sup>和 Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 菌株的小鼠死亡率分别为 91.7%、75%, 二者没有统计学差异( $P=0.183$ ), 但 Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 菌株感染组有降低趋势; 定植结果显示, *yycF* 缺陷菌株感染组的肺匀浆菌载量显著低于对照组( $P=0.033$ )。【结论】成功构建 *yycF* 缺陷菌株, 并初步证明 *yycF* 基因会影响肺炎链球菌的生物性状和致病能力, 为后续探讨 YycFG 双组分系统对肺炎链球菌致病能力调控机制的研究奠定了基础。

**关键词:** 肺炎链球菌, YycFG 双组分系统, 粘附, 侵袭, 抗吞噬

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (81772153)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-23-68485136; E-mail: zhangxuemei@cqmu.edu.cn

**Received:** 11-08-2019; **Accepted:** 04-12-2019; **Published online:** 12-12-2019

**基金项目:** 国家自然科学基金(81772153)

**\*通信作者:** Tel: 023-68485136; E-mail: zhangxuemei@cqmu.edu.cn

**收稿日期:** 2019-08-11; **接受日期:** 2019-12-04; **网络首发日期:** 2019-12-12

## Construction of *yycF*-deficient mutant *Streptococcus pneumoniae* D39 with constitutive expression of *pcsB* and study on its pathogenicity

XIAO Yun-Ju<sup>1</sup> ZHANG Jing-Hui<sup>1</sup> XIAO Sheng-Nan<sup>2</sup> YIN Yi-Bing<sup>1</sup>  
ZHANG Xue-Mei<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup> Department of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Diagnostic Medicine Designated by the Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

<sup>2</sup> Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

**Abstract:** [Background] The YycFG two-component regulatory system plays a critical role in the *Streptococcus pneumoniae* response to the external environment. The response regulator protein YycF (VicR) is essential for the growth of *Streptococcus pneumoniae*, but the function of YycF in regulating bacterial virulence is unclear. [Objective] To analyze the effect of the response regulator protein YycF on biological characteristics and pathogenicity, the *pcsB* constitutive-expressing, *yycF*-deficient mutant strain of *Streptococcus pneumoniae* was constructed and characterized. [Methods] First, the *pcsB* constitutive expression strain (Pc-PcsB<sup>+</sup>) was constructed by janus cassette (JC) counter selection, and the *yycF* gene in Pc-PcsB<sup>+</sup> was replaced with an erythromycin resistance gene (*erm*). The growth characteristics, the contents of capsular polysaccharide, cell adhesion and invasion abilities, and pathogenicity of D39*rpsL41*, Pc-PcsB<sup>+</sup> and Pc-PcsB<sup>+</sup> $\Delta$ *yycF* were assessed. [Results] The *yycF*-deficient mutant strain (Pc-PcsB<sup>+</sup> $\Delta$ *yycF*) was derived from Pc-PcsB<sup>+</sup>. Compared with Pc-PcsB<sup>+</sup>, we observed slower growth, abnormal division, increasing amount of capsular polysaccharide in intracellular and smaller molecule capsular polysaccharide in the Pc-PcsB<sup>+</sup> $\Delta$ *yycF*. *In vitro* studies showed that the adherence ability of Pc-PcsB<sup>+</sup> $\Delta$ *yycF* was significantly reduced than that of Pc-PcsB<sup>+</sup> ( $P=0.006$ ). The virulence test suggested that all mice infected with D39*rpsL41* died, while the mortality rates of mice challenged with Pc-PcsB<sup>+</sup>, Pc-PcsB<sup>+</sup> $\Delta$ *yycF* were decreased to 91.7% and 75% respectively, though no statistical significance between them was observed ( $P=0.183$ ). The colonization study revealed that the bacterial burden of Pc-PcsB<sup>+</sup> $\Delta$ *yycF* in the lung tissue was significantly lower than that of Pc-PcsB<sup>+</sup> ( $P=0.033$ ). [Conclusion] In this study, the *yycF*-deficient mutant *Streptococcus pneumoniae* D39 was constructed successfully, and the biological characteristics and pathogenicity of Pc-PcsB<sup>+</sup> $\Delta$ *yycF* were identified, which provide a theoretical basis for further study on the regulatory mechanism of YycFG on the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, YycFG two-component regulatory system, Adhesion, Invasion, Resistance to phagocytosis

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*)是人类呼吸道的常见病原体,可引起肺炎、中耳炎、脑膜炎、菌血症和败血症等疾病<sup>[1-4]</sup>。儿童、老年人以及免疫力低下的慢性病患者或接受免疫抑制治疗的患者是肺炎链球菌感染的高危人群<sup>[5-7]</sup>。同时,肺炎链球菌也可以无症状地定植于健康人的鼻咽部,细菌的定植和侵袭需要肺炎链球菌调控其相关基因的表达以适应宿主体内不同的环境条件<sup>[8-9]</sup>。双组分信号转导系统(two-component signal

transduction systems, TCS)在细菌适应外界环境中扮演了重要角色<sup>[10]</sup>。

最早发现于枯草芽孢杆菌中的 YycFG (也被称作 VicRK、WalRK、MicAB、TCS02)系统广泛存在于低(G+C)mol%含量的革兰氏阳性菌中,其基因高度保守<sup>[11-12]</sup>。该系统对细胞存活至关重要,在芽孢杆菌和葡萄球菌属中,表达组氨酸激酶 YycG 和反应调节蛋白 YycF 的基因都是生长必需基因,不能被敲除<sup>[13-14]</sup>。但在链球菌中,只有反应调节蛋白

YycF 是细菌生长所必需的,而组氨酸激酶 YycG 是非必需的,所以 *yycG* 可以被敲除而 *yycF* 不能直接敲除<sup>[10,15]</sup>。目前的研究表明,在枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌中 YycFG 双组分系统参与维持细胞壁稳态、细胞膜形成和细胞分裂等<sup>[11,16-17]</sup>。

研究显示,YycFG 也参与肺炎链球菌对宿主感染能力的调控,YycG 缺陷导致其感染小鼠的致死率降低<sup>[18]</sup>。双组分系统对细菌性状的调控不完全是二者同时发挥作用,双组分系统 ComDE 中,ComE 对细菌的某些性状的调控并不依赖于 ComD<sup>[19]</sup>。因此,YycF 是否参与肺炎链球菌感染宿主能力的调控尚需进一步研究。

与枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌不同,肺炎链球菌的 YycFG 双组分系统中,仅有 *yycF* 是必需基因。*PcsB* 作为一种肺炎链球菌细胞壁水解酶,受 YycFG 双组分系统调控,有研究表明,YycFG 系统通过调控 *pcsB* 影响细胞壁的分裂,*pcsB* 对细菌来说同样是必不可少的,过表达 *pcsB* 可以消除 YycF 的必需作用<sup>[10]</sup>。因此,本研究拟通过 *pcsB* 组成型表达构建肺炎链球菌 *yycF* 缺陷菌株,观察 *yycF* 基因缺陷后细菌的体外生长情况,并建立体内外细菌感染模型,探究 *yycF* 基因缺陷后细菌感染宿主能力的变化,以鉴定 YycF 在调控肺炎链球菌致病能力中的作用,为后续分子调控机制研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,6-8 周龄,雌性,购买于重庆医科大学实验动物中心,所有动物实验操作均遵照重庆医科大学实验动物中心规范和要求执行。

### 1.2 菌株、培养基、主要试剂和仪器

肺炎链球菌 D39、TH4702 菌株(含 JC 片段)由清华大学张敬仁教授惠赠。D39 链霉素抗性菌株(D39*rpsL41*)是通过在 *S. pn* D39 中单碱基突变(A→C) *rpsL* 基因的 Lys56(AAA)为 Thr(ACA)获得。C+Y 半

合或培养基:常规 C+Y 培养基<sup>[20-21]</sup>中加 5.0 g/L Yeast 提取物。CTM 培养基:10 mL C+Y 半合成培养基中含 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 0.2% BSA。哥伦比亚血平板,重庆庞通公司。

感受态刺激因子 CSP1,上海强耀生物技术有限公司;Prime-STAR DNA 高保真聚合酶试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、DNA Marker、蛋白 Marker、RNA 逆转录试剂盒、SYBR Premix *ExTaq* 试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;ECL 试剂盒,MillPore 公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)技术有限公司;引物合成及测序,生工生物工程(上海)股份有限公司。

PCR 仪、蛋白电泳仪、凝胶成像系统,Bio-Rad 公司;琼脂糖水平电泳仪,北京六一生物科技有限公司;分光光度计,Amersham Biosciences 公司。NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 插入片段的制备

以肺炎链球菌 D39 全基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *mreCD* (950 bp)和 *pcsB/1* (889 bp),以 TH4702 菌株为模板扩增 JC 片段(1 465 bp),Pc 启动子(100 bp)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表 1,通过 Overlap-PCR 连接 *mreCD*-JC-Pc-*pcsB/1*,胶回收连接片段。

以肺炎链球菌 Pc-PcsB<sup>+</sup>全基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *mreD* (518 bp)和 Pc-*pcsB/2* (594 bp),通过 Overlap-PCR 连接 *mreD*-Pc-*pcsB/2*,胶回收连接片段。

以肺炎链球菌 D39 全基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *yycF-up* (497 bp)和 *yycF-dw* (453 bp),以 CMP8 红霉素基因作模板扩增 *erm* (738 bp),通过 Overlap-PCR 连接 *yycF-up-erm-yycF-dw*,胶回收连接片段。

### 1.4 肺炎链球菌的实验室转化与鉴定

取-80 °C 保存的肺炎链球菌 D39*rpsL41* 接种于哥伦比亚血平板,置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 孵箱活化过夜,用接种环挑取血平板上的菌落接种到新的 C+Y 培养基中待 OD<sub>600</sub> 为 0.5 左右,取 50 μL 菌液

接种于 5 mL CTM 培养基, 当细菌生长至  $OD_{600}$  为 0.08–0.10 时, 加入感受态刺激因子 CSP1, 37 °C 孵育 10 min, 加入 400 ng 连接片段, 冰上放置 30 min, 37 °C 孵育 90 min 后涂布于含相应筛选抗生素(红霉素 0.25  $\mu$ g/mL, 卡那霉素 200  $\mu$ g/mL, 链霉素 150  $\mu$ g/mL)的平板上, 37 °C 孵育培养 24 h 得到相应的转化子。挑取平板上的单克隆作模板, 分别使用外侧引物用 PCR 鉴定阳性转化子, 并将阳性 PCR 片段送测序鉴定。

1.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

细菌生长于 C+Y 培养基中, 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 提取 RNA 使用细菌总 RNA 提取

试剂盒, 用 1%琼脂糖凝胶鉴定提取的总 RNA 样本降解程度, NanoDrop 1000 测定 RNA 浓度, RNA 逆转录试剂盒进行逆转录。将逆转录得到的 cDNA 使用 SYBR Premix *ExTaq* 试剂盒进行实时定量分析, PCR 条件和体系参考文献[22], 数据处理时以 *gyrB* 作为内参基因, 实验中涉及的实时定量引物见表 1。

1.6 绘制生长曲线

细菌血平板上培养过夜, 用无菌 PBS 冲洗血平板上活化的菌落, PBS 洗 2 遍, 调整  $OD_{600}$  为 0.5, 取 100  $\mu$ L 接种于 5 mL 新的 C+Y 培养基中, 每 30 min 测定  $OD_{600}$  的吸光度值, 以  $OD_{600}$  吸光度值为纵坐标, 时间为横坐标, 绘制生长曲线。

表 1 引物序列  
Table 1 Primers sequence

引物 Primers	序列 Sequence (5'→3')	模板 Template	扩增产物 Amplicon product
Pr1001	tctccggtatcttgaagcagga	D39 <i>rpsL41</i>	<i>mreCD</i>
Pr1002	caaggagttttcagcattatcctatagataatattttcaaa	D39 <i>rpsL41</i>	<i>mreCD</i>
Pr1003	tttgaaaaatattatctataagataatgctgaaaactccttg	TH4702	JC
Pr1004	caaacaaattttggcccgcccttcttatgcttttgacgtt	TH4702	JC
Pr1005	aacgtccaaaagcataaggaaaggccggcccaaatgtgttg	T1T2Pc	Pc
Pr1006	gtaatcactccttcttaattacaaa	T1T2Pc	Pc
Pr1007	tttgaattaagaaggagtattac-atgaagaaaaaatcttagcgta	D39 <i>rpsL41</i>	<i>pcsB</i> /1
Pr1008	gtcaatgcttgagcatcatcagcc	D39 <i>rpsL41</i>	<i>pcsB</i> /1
Pr1009	tacaaatcaacaaattttggcccggttatagataatattttcaa	D39 <i>rpsL41</i>	<i>mreD</i>
Pr1010	atgagacagttgaagcgagttgg	D39 <i>rpsL41</i>	<i>mreD</i>
Pr1011	ttgaaaaatattatctataaccgggcccaaatgtttgatttgta	Pc-PcsB <sup>+</sup> (JC)	Pc- <i>pcsB</i> /2
Pr1012	ggctgatgatgctcaagcattgac	Pc-PcsB <sup>+</sup> (JC)	Pc- <i>pcsB</i> /2
Pr1013	ccatggaccgttatccaatta	D39 <i>rpsL41</i>	<i>yycF-up</i>
Pr1014	atcaacaaattttggcccggtagctagctcttggtactgtctaa	D39 <i>rpsL41</i>	<i>yycF-up</i>
Pr1015	attctatgagtcgctgcccactgtccgcacagtgatgtgac	D39 <i>rpsL41</i>	<i>yycF-dw</i>
Pr1016	ccccgacggttagtcgaagaacccc	D39 <i>rpsL41</i>	<i>yycF-dw</i>
Erm-F	atgaacaaaatataaaatatt	$\Delta$ <i>fabT</i> (erm)	<i>erm</i>
Erm-R	ttatttctcccggttaataat	$\Delta$ <i>fabT</i> (erm)	<i>erm</i>
q-PCR			
Pr1066	cattggcaccttgggctggag	<i>pcsB</i> (cDNA)	
Pr1067	cctgtacggaacctgctgctg	<i>pcsB</i> (cDNA)	
Pr1068	tcagcagaccagggtggata	<i>mutY</i> (cDNA)	
Pr1069	gtaaactctctcaggcgca	<i>mutY</i> (cDNA)	
Pr1070	agcaggagaaggaagaacgc	<i>yycG</i> (cDNA)	
Pr1071	tggaggagatcctccgtcacat	<i>yycG</i> (cDNA)	
Pc	ccgggcccaaatgtttgattgtatctaaaattttgtataataggaattgaagttaaattagatgcta aaaattgttaattaagaaggagtattac		

### 1.7 ELISA 检测细菌表面荚膜多糖含量

将细菌培养至 C+Y 培养基中,待  $OD_{600}$  为 0.5 左右,收集 5 mL 菌液,4 °C、12 000 r/min 离心 5 min,上清通过滤器收集到 EP 管,细菌沉淀用 PBS 洗 2 遍,重悬后 58 °C 水浴处理 45 min,12 000 r/min 离心 5 min, PBS 重悬菌体。将上述样本于 96 孔板中 4 °C 包被过夜,以二型荚膜多抗为一抗(1:5 000),羊抗兔 IgG-HRP 为二抗(1:8 000),显色后通过检测  $OD_{450}$  吸光度水平测定细菌表面荚膜多糖含量。

### 1.8 FITC-葡聚糖法检测荚膜多糖含量

将细菌培养至 C+Y 培养基中,待  $OD_{600}$  为 0.5 时收集菌体, PBS 重悬,10  $\mu$ L 菌液加入 2  $\mu$ L FITC-葡聚糖(10 mg/mL),吸取 2  $\mu$ L 到载玻片上,盖玻片封片后在荧光显微镜下观察细菌排除 FITC 的面积。

### 1.9 Western blot 分析荚膜多糖条带模式

将细菌培养至 C+Y 培养基中,待  $OD_{600}$  为 0.5 左右,收集 5 mL 菌液,4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗 2 次,离心弃上清,在菌体沉淀中加入 200  $\mu$ L 0.5% DOC 重悬,37 °C 水浴 15 min,使菌悬液裂解完全。各取 60  $\mu$ L 裂解后的菌液,加 1 $\times$ Loading buffer 于沸水煮 10 min。全菌裂解产物经 SDS-PAGE 电泳分离后转膜。以二型荚膜多抗为一抗(1:2 000),羊抗兔 IgG-HRP 为二抗(1:8 000),使用 ECL 显示剂检测菌体中荚膜多糖的条带分布。

### 1.10 体外细菌粘附侵袭与抗吞噬实验

将腺癌人类肺泡基底上皮细胞 A549 接种至 12 孔板中,约  $5\times 10^5$  cell/孔;将 *S. pn* 培养于 C+Y 中至  $OD_{600}$  为 0.5 左右,收集菌体 PBS 洗 2 遍, DMEM 重悬细菌。使用无菌的 PBS 将 A549 细胞洗 2 遍,分别加入  $2\times 10^7$  CFU/孔的 D39rpsl41、Pc-PcsB<sup>+</sup>、Pc-PcsB<sup>+</sup> $\Delta$ yycF 菌液,37 °C 孵育 30 min;粘附实验:吸尽 PBS,加入 200  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,室温放置 10 min 使细胞裂解,并彻底刮下细胞,将裂解液梯度稀释并铺血平板,次日计数。侵袭实验:弃菌液,用 PBS 冲洗细胞 5 遍,加入 100  $\mu$ g/mL 的庆大霉素,37 °C 孵育 15 min,然后弃抗生素, PBS 冲洗细菌 5 遍,破菌后铺板计数。将没有加抗生素处理组

铺板计数的细菌数计为粘附和入侵的总细菌数,抗生素处理组铺板计数的细菌数计为入侵的细菌数,侵袭率(%)=入侵的细菌计数/加入的总细菌数 $\times$ 100。

小鼠腹腔注射 1 mL 无菌石蜡油募集巨噬细胞,5–7 d 断颈处死小鼠,用无菌 PBS 灌洗腹腔提取原代巨噬细胞,红细胞裂解液处理 2 min,铺至 12 孔板,约  $1\times 10^6$  cell/孔,培养原代巨噬细胞过夜。将 *S. pn* 培养于 C+Y 中至  $OD_{600}$  为 0.5 左右,收取菌体用 PBS 洗 2 遍, DMEM 重悬细菌。培养过夜的巨噬细胞使用无菌的 PBS 洗两遍,分别加入  $2\times 10^7$  CFU/孔 D39rpsl41、Pc-PcsB<sup>+</sup>、Pc-PcsB<sup>+</sup> $\Delta$ yycF,37 °C 孵育 30 min;后续实验同粘附侵袭,分抗生素处理组和无抗生素处理组,破菌后铺板计数。吞噬率(%)=吞入的细菌数/加入的总细菌数 $\times$ 100。

### 1.11 体内生存率和定殖实验

将 D39rpsl41、Pc-PcsB<sup>+</sup>、Pc-PcsB<sup>+</sup> $\Delta$ yycF 于 C+Y 中培养至  $OD_{600}$  为 0.5 时收集菌体,无菌 PBS 洗 2 遍,用无菌生理盐水重悬调至菌浓度为  $10^8$  CFU/20  $\mu$ L。将 36 只 6–8 周的雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组,每组 12 只,分别鼻腔滴注 20  $\mu$ L D39rpsl41、Pc-PcsB<sup>+</sup>和 Pc-PcsB<sup>+</sup> $\Delta$ yycF 菌液,构建肺炎模型,每天观察小鼠的生存状态,连续观察 14 d。18 只 6–8 周的雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组,每组 6 只,分别鼻腔滴注  $2\times 10^7$  CFU 的 D39rpsl41、Pc-PcsB<sup>+</sup>和 Pc-PcsB<sup>+</sup> $\Delta$ yycF 菌液,构建肺炎模型,攻毒 48 h 后分别取小鼠的鼻腔灌洗液、心脏血、肺匀浆进行连续梯度稀释并铺板计数。

### 1.12 统计学分析

小鼠毒力实验和小鼠定殖实验采用非配对 *t* 检验;以 Graphpad 统计软件进行分析;小鼠存活率比较采用 Log-rank 检验;以  $P<0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 *S. pn* Pc-PcsB<sup>+</sup>菌株的构建及鉴定

通过 *pcsB* 组成型表达构建肺炎链球菌 *yycF* 缺

陷均(图 1),通过 PCR 重组得到 *mreCD*-JC-Pc-*pcsB*/1 (3 404 bp)和 *mreD*-Pc-*pcsB*/2 (1 202 bp)片段(图 2A、B),利用肺炎链球菌自然转化,将带同源臂的连接片段 *mreCD*-JC-Pc-*pcsB*/1 重组到链霉素抗性的肺炎链球菌(D39*rpsL*41)中,由于 JC 片段含有卡那霉素抗性基因和 *rpsL*<sup>+</sup> (未突变的 *rpsL* 基因),当 JC 片

段整合到 D39*rpsL*41 背景菌株后,细菌表现为链霉素敏感,卡那霉素抗性(图 1A),用卡那霉素血平板筛选阳性菌株。以 Pr1001、Pr1008 为引物进行 PCR 扩增,D39*rpsL*41 菌株扩增出 1 932 bp 大小的目的片段,JC-Pc-*PcsB*<sup>+</sup>菌株扩增出 3 404 bp 大小的目的片段(图 2C)。

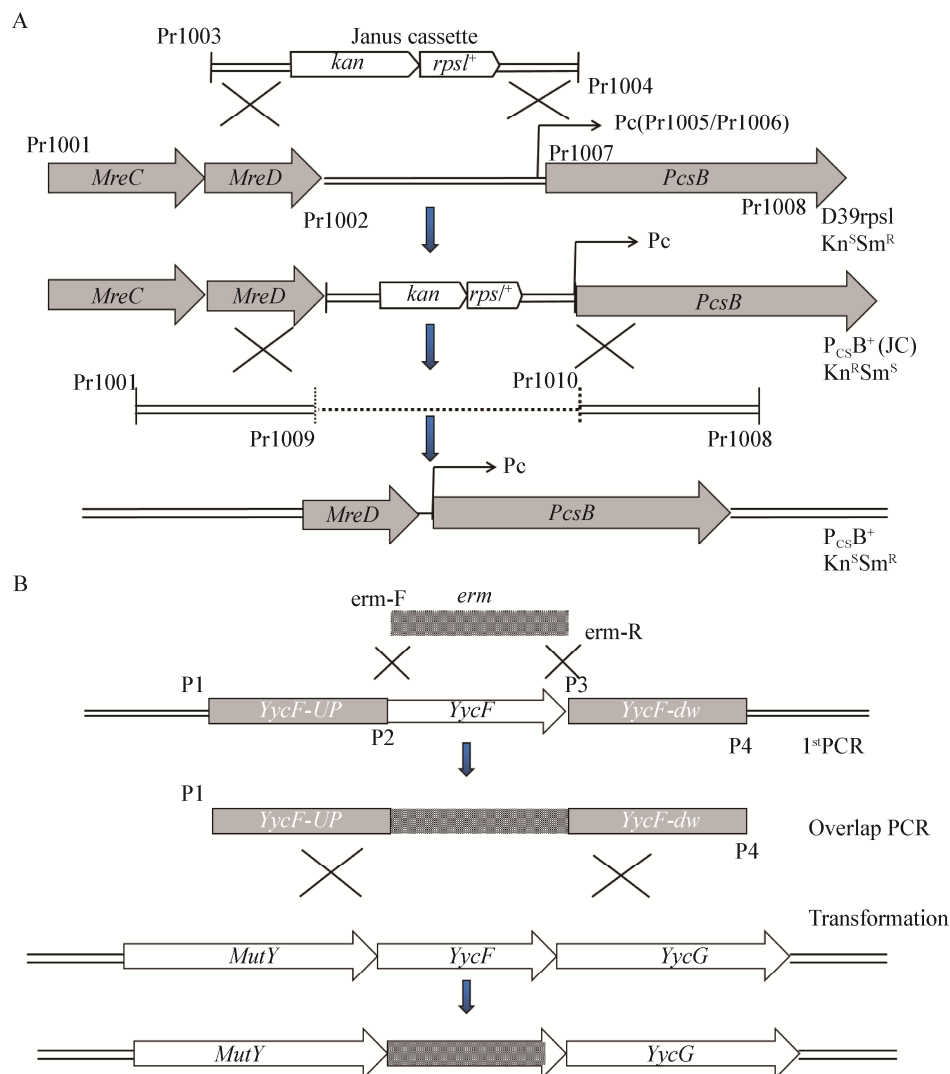
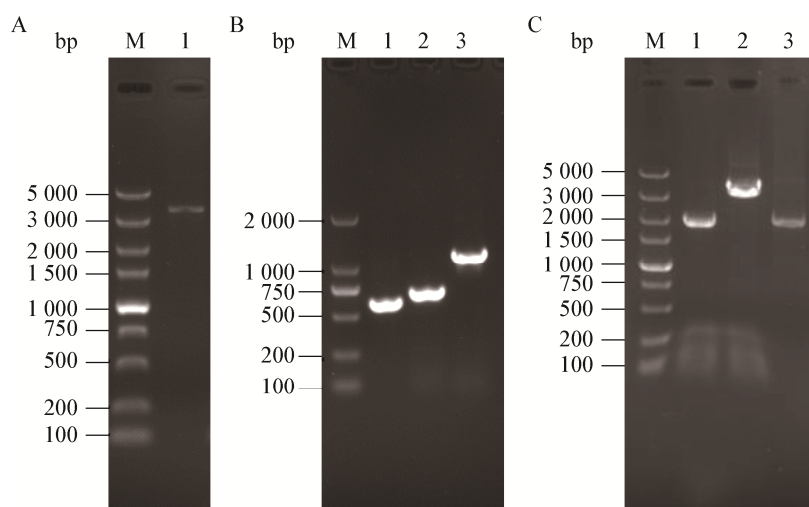


图 1 Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 菌株构建原理示意图

Figure 1 The construction theory of the *yycF*-deficient mutant strain

注: A: JC 反选构建 Pc-PcsB<sup>+</sup>菌株示意图; B: LFH-PCR 断裂失活构建 Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 菌株示意图。

Note: A: Construction of *pcsB* constitutive expression strain (Pc-PcsB<sup>+</sup>) by Janus cassette (JC) counter selection; B: Construction of *yycF*-deficient mutant strain (Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF*) by LFH-PCR.

图2 PCR鉴定Pc-PcsB<sup>+</sup>菌株Figure 2 Identification of the Pc-PcsB<sup>+</sup> strain by PCR

注: A: M: DNA Marker, 1: *mreCD*-JC-Pc-*pcsB*/1 重组片段; B: M: DNA Marker, 1-3: *mreD*、Pc-*PcsB*/2、*mreD*-Pc-*pcsB*/2 重组片段; C: M: DNA Marker, 1-3: *mreCD*-*pcsB*/1、*mreCD*-JC-Pc-*pcsB*/1、*mreCD*-Pc-*pcsB*/1.

Note: A: M: DNA Marker, 1: recombinant *mreCD*-JC-Pc-*pcsB*/1 fragment; B: M: DNA Marker, 1-3: *mreD*, Pc-*PcsB*/2, recombinant *mreD*-Pc-*pcsB*/2 fragment; C: M: DNA Marker, 1-3: *mreCD*-*pcsB*/1, *mreCD*-JC-Pc-*pcsB*/1, *mreCD*-Pc-*pcsB*/1.

成功插入 JC-Pc 片段后, 再次利用同源重组敲除 JC 片段(图 1A)。当 JC 片段置换出来后, 用链霉素抗性血平板筛选阳性菌株。以 Pr1001、Pr1008 引物进行 PCR 扩增, JC-Pc-PcsB<sup>+</sup>菌株扩增出 3 404 bp 大小的目的片段, Pc-PcsB<sup>+</sup>菌株扩增出 2 032 bp 大小的目的片段(图 2C), PCR 扩增及测序结果表明 Pc-PcsB<sup>+</sup>菌株构建成功。

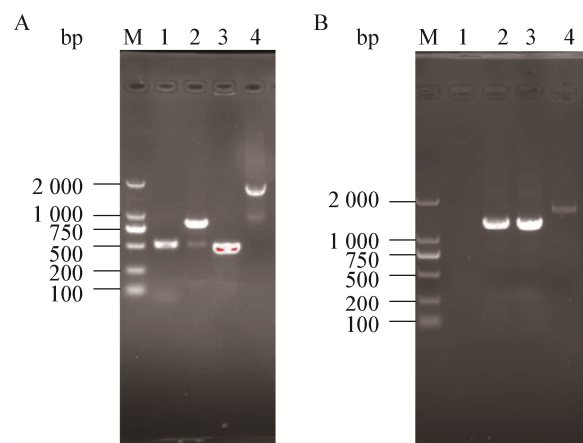
## 2.2 *S. pn* Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 菌株的构建及鉴定

PCR 扩增 *yycF*-*up*、*erm*、*yycF*-*dw* 片段并进行重组(图 3A), 将 *yycF*-*up*-*erm*-*yycF*-*dw* 重组片段转到 Pc-PcsB<sup>+</sup>菌株, 用红霉素抗性平板筛选阳性菌落 PCR 鉴定, 以 Pr1013、*erm*-R 为引物, *yycF* 缺陷菌株为模板扩增出 1 235 bp 大小的目的片段, 以 *erm*-F、Pr1016 为引物, *yycF*Δ 缺陷菌株为模板扩增出 1 191 bp 大小的目的片段, 以 Pr1013、Pr1016 为引物, *yycF* 缺陷菌株为模板扩增出 1 688 bp 大小的目的片段(图 3B), PCR 扩增及测序结果表明 Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 菌株构建成功。

## 2.3 细菌体外生长情况

生长曲线结果显示, Pc-PcsB<sup>+</sup> 的生长较 D39*rpsL41* 缓慢, Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 与 Pc-PcsB<sup>+</sup>相比生

长显著迟缓(图 4A), 3 个菌株在血平板上的菌落形态无显著差异(图 4B-D)。镜下观察细菌未染色和革兰染色标本, 发现 Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 有明显的分裂异常, 呈现为长链状梭形细菌(图 4E)。

图3 PCR鉴定Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF*菌株Figure 3 Identification of the Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* strain by PCR

注: A: M: DNA Marker, 1-4: *yycF*-*up*、*erm*、*yycF*-*dw*、*yycF*-*up*-*erm*-*yycF*-*dw* 重组片段; B: M: DNA marker, 1-4: 阴性对照、*yycF*-*up*-*erm*、*erm*-*yycF*-*dw*、*yycF*-*up*-*erm*-*yycF*-*dw*.

Note: A: M: DNA Marker, 1-4: *yycF*-*up*, *erm*, *yycF*-*dw*, recombinant *yycF*-*up*-*erm*-*yycF*-*dw* fragment; B: M: DNA marker, 1-4: Negative control, *yycF*-*up*-*erm*, *erm*-*yycF*-*dw*, *yycF*-*up*-*erm*-*yycF*-*dw*.

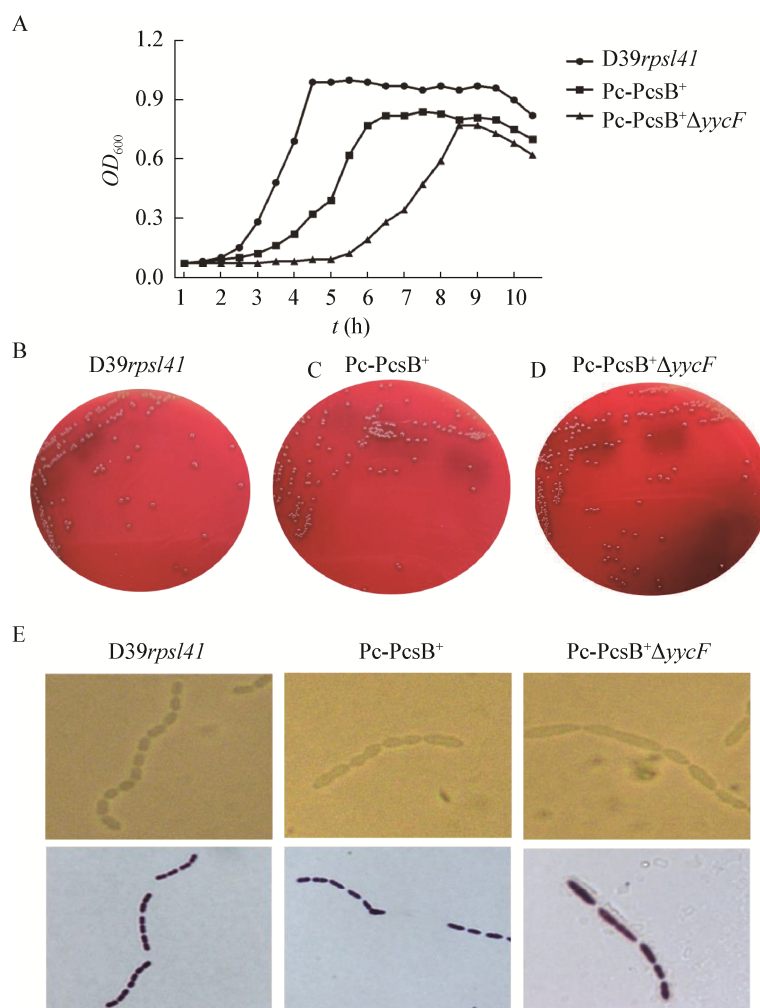


图4 D39rpsl41、Pc-PcsB<sup>+</sup>、Pc-PcsB<sup>+</sup>ΔyycF 生长曲线和形态

Figure 4 The growth curves and morphological of D39rpsl41, Pc-PcsB<sup>+</sup>, Pc-PcsB<sup>+</sup>ΔyycF

注: A: 生长曲线; B-D: 血平板上的菌落形态; E: 显微镜下未染色(上排)和革兰染色(下排)的细菌形态。

Note: A: Growth curves; B-D: Colony morphology on blood plate; E: Morphological observation of bacteria under the phase contrast microscope, unstained (upper) and Gram stained (bottom).

## 2.4 D39rpsl41、Pc-PcsB<sup>+</sup>、Pc-PcsB<sup>+</sup>ΔyycF 菌株中 *pcsB* 基因的转录水平和 *yycF* 上下游基因的转录水平

为明确 D39rpsl41、Pc-PcsB<sup>+</sup>、Pc-PcsB<sup>+</sup>ΔyycF 菌株中 *pcsB* 基因的转录水平, 提取 3 组菌株不同时间点的 RNA 进行荧光定量 PCR 分析。结果显示, D39rpsl41、Pc-PcsB<sup>+</sup> 和 Pc-PcsB<sup>+</sup>ΔyycF 菌株在 OD<sub>600</sub> 为 0.3 时的 *pcsB* 的转录水平与相应菌株在 OD<sub>600</sub> 为 0.6 时的水平均没有显著差异, 提示无论是 *pcsB* 基因野生启动子还是原位整合 Pc 启动子, *pcsB*

基因均为恒定表达, 但 Pc-PcsB<sup>+</sup> 和 Pc-PcsB<sup>+</sup>ΔyycF 菌株在不同 OD<sub>600</sub> 值时的 *pcsB* 的转录水平均显著高于 D39rpsl41 菌株, 提示 Pc 启动子较 *pcsB* 野生启动子的效率高(图 5A)。

为明确 *yycF* 是否影响其邻近基因的表达, 检测 *yycF* 上下游基因的转录水平, 结果显示 3 个菌株中 *yycF* 上游基因 *mutY* 和下游基因 *yycG* 的转录水平没有显著差异, 提示 *yycF* 基因缺陷后不影响上下游基因的表达, 不存在极性效应(图 5B)。

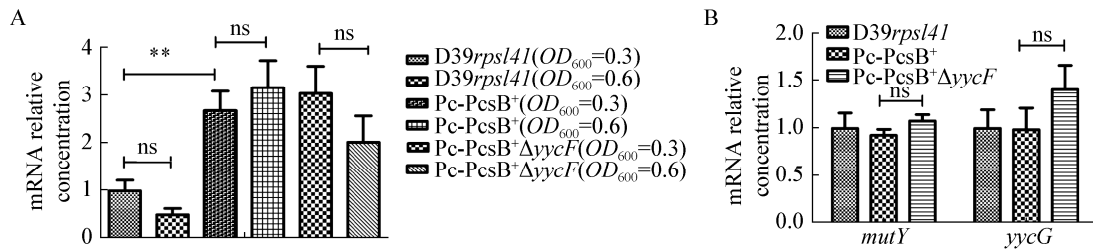


图5 D39rpsl41、Pc-PcsB<sup>+</sup>和 Pc-PcsB<sup>+</sup>ΔyycF 菌株中 *pcsB*、*mutY*、*yycG* 基因的转录水平

Figure 5 Transcription levels of the *pcsB*, *mutY* and *yycG* genes in D39rpsl41, Pc-PcsB<sup>+</sup> and Pc-PcsB<sup>+</sup>ΔyycF

注: A: *pcsB* 的相对转录水平; B: *mutY* 和 *yycG* 的相对转录水平. *gyrB* 作为内参基因. \*\*:  $P < 0.01$ . ns: 无统计学差异.

Note: A: The relative transcription levels (n-fold) of *pcsB*; B: The relative transcription levels (n-fold) of *mutY* and *yycG*. *gyrB* is the reference gene. \*\*:  $P < 0.01$ . ns: No significance.

## 2.5 *yycF* 缺陷后菌株中胞内荚膜多糖和小分子荚膜多糖增多

荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)是肺炎链球菌重要的毒力因子,无荚膜的肺炎链球菌基本无致病能力。我们前期发现 *yycG* 缺陷时,细菌荚膜合成异常<sup>[23]</sup>,因此,推测 YycF 可能参与荚膜多糖的合成调控。研究显示, CPS 分布于细胞表面才

能发挥其功能<sup>[24]</sup>,因此,我们首先分析了 *yycF* 缺陷前后细菌表面 CPS 的含量。分别采用 ELISA 和 FITC-葡聚糖法检测 D39rpsl41、Pc-PcsB<sup>+</sup> 和 Pc-PcsB<sup>+</sup>ΔyycF 表面荚膜多糖含量,结果均显示 Pc-PcsB<sup>+</sup>ΔyycF 菌株表面 CPS 的含量与 Pc-PcsB<sup>+</sup>菌株没有显著差异(图 6A-C),提示 YycF 并不影响细菌表面 CPS 的含量。

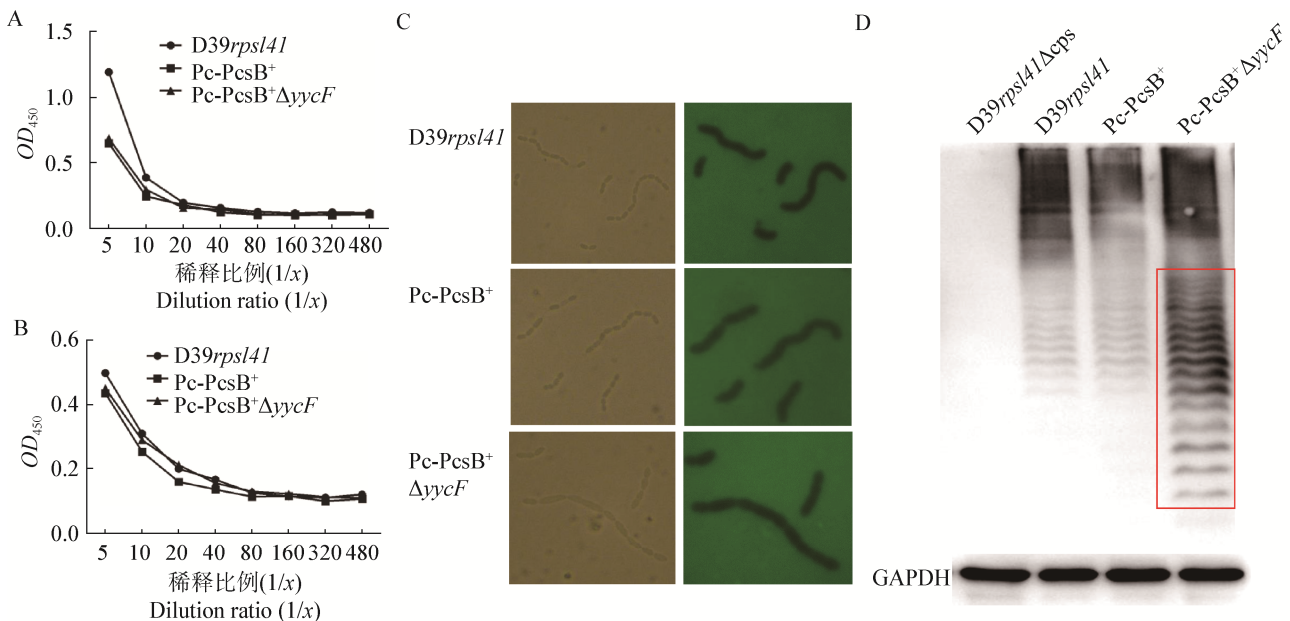


图6 荚膜多糖含量分析

Figure 6 Analysis on the content of capsular polysaccharide

注: A: ELISA 检测细菌培养上清中荚膜多糖含量; B: ELISA 检测细菌表面荚膜多糖含; C: FITC-葡聚糖法检测细菌表面荚膜多糖含量; D: Western blot 分析全菌的荚膜多糖的条带分布模式。

Note: A: The content of CPS in bacteria culture supernatant was detected by ELISA; B: The content of CPS on the surface of bacteria was detected by ELISA; C: The content of CPS on the surface of bacteria was detected by Dextran-FITC; D: The banding pattern of CPS of the whole bacteria lysate was detected by Western blot.

为进一步观察 YycF 是否影响荚膜分子的构成, 采用可显示分子大小的 Western blot 分析 CPS。为了减少操作误差, 直接分析全菌裂解的总 CPS 含量, 包含细菌表面 CPS 和细胞内 CPS。结果显示, Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 菌株 CPS 总量和小分子条带较 Pc-PcsB<sup>+</sup> 菌株明显增多(图 6D), 结合 ELISA 和 FITC-葡聚糖法的检测结果, 提示 *yycF* 缺陷后可导致细胞内小分子 CPS 合成增多。

## 2.6 *yycF* 缺陷菌株体外粘附能力减弱

为初步探究细菌的体外粘附侵袭能力的变化, 检测了 3 组细菌对 A549 细胞株的粘附和侵袭能力。实验结果显示 Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 菌株对 A549 细胞的

粘附能力较亲本菌株显著减弱( $P=0.006$ ), 但 3 组菌株侵袭率无显著差异(图 7)。

## 2.7 *yycF* 缺陷菌株粘附巨噬细胞的能力减弱

对比 D39*rpsL41*、Pc-PcsB<sup>+</sup>和 Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 在巨噬细胞中的抗吞噬能力, 结果显示, Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 组粘附在巨噬细胞表面以及被吞噬入巨噬细胞内的细菌量较 D39*rpsL41*、Pc-PcsB<sup>+</sup>均显著减少。同时, 观察到巨噬细胞对 Pc-PcsB<sup>+</sup>Δ*yycF* 的吞噬率较 Pc-PcsB<sup>+</sup>菌株升高, 但无统计学差异( $P=0.14$ ) (图 8)。该结果提示 Pc-PcsB<sup>+</sup>菌株缺陷 *yycF* 后, 其对巨噬细胞的粘附能力减弱, 但抗吞噬能力无显著改变。

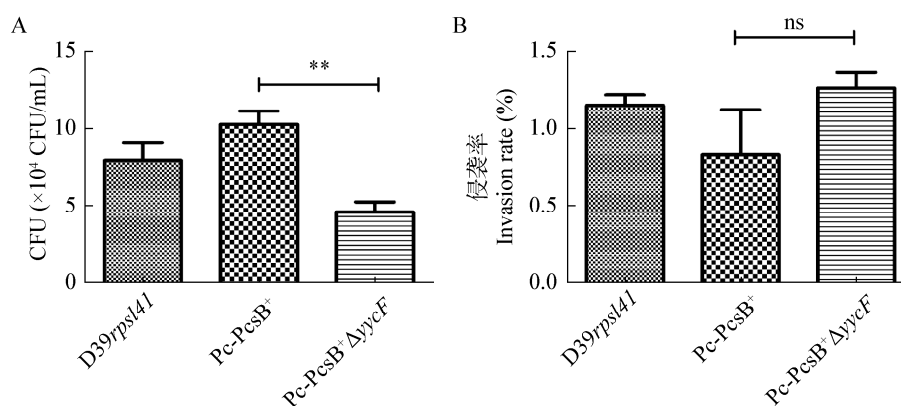


图 7 A549 细胞体外粘附与侵袭试验

Figure 7 Adhesion and invasion ability to A549 cells

注: A: A549 细胞表面粘附及胞内侵袭的细菌总数; B: 侵袭率. \*\*:  $P<0.01$ . ns: 无统计学差异。

Note: A: Total number of bacteria adhering to the surface of A549 cells and invading to 549 cells; B: The ratio of invasion. \*\*:  $P<0.01$ . ns: No significance.

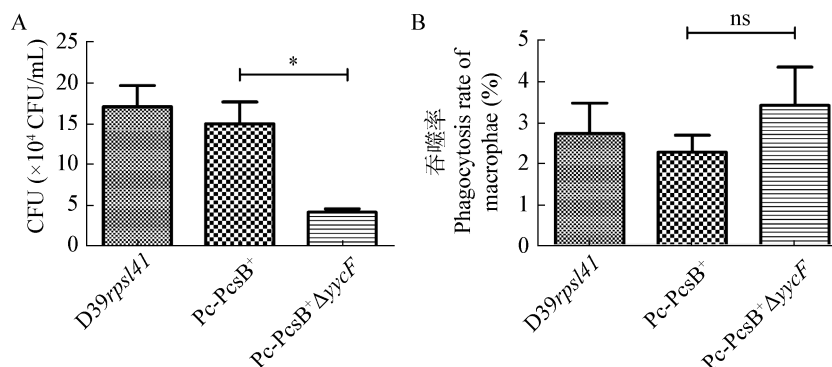


图 8 抗巨噬细胞吞噬能力

Figure 8 The ability of anti-macrophage phagocytosis

注: A: 巨噬细胞表面粘附及胞内吞噬的细菌总数; B: 吞噬率. \*:  $P<0.05$ . ns: 无统计学差异。

Note: A: Total number of bacteria adhering to the surface of macrophages and invading to macrophages; B: The ratio of phagocytosis. \*:  $P<0.05$ . ns: No significance.

## 2.8 *yycF* 缺陷后菌株在小鼠体内肺部定殖能力减弱

为进一步验证缺陷菌株在体内的毒力, 通过鼻腔攻毒的方式感染小鼠构建小鼠肺炎模型, 在 14 d 的观察时间中, 感染  $\text{Pc-PcsB}^+\Delta\text{yycF}$ 、 $\text{Pc-PcsB}^+$  的小鼠生存率高于  $\text{D39rpsl41}$ , 但  $\text{Pc-PcsB}^+\Delta\text{yycF}$ 、 $\text{Pc-PcsB}^+$  之间无显著差异(图 9A)。菌载量结果显示, 3 组小鼠鼻腔灌洗液的细菌载量无显著差异,  $\text{Pc-PcsB}^+\Delta\text{yycF}$  感染组的肺匀浆菌载量显著低于对照组( $P=0.033$ ), 心脏血菌载量结果显示, 野生菌感染组和  $\text{Pc-PcsB}^+$  感染组均有细菌入血, 但  $\text{yycF}$  缺陷菌株感染组均未入血, 该结果提示  $\text{yycF}$  缺陷后细菌的播散能力降低(图 9B-D)。

## 3 讨论与结论

研究显示, 恒定表达 *pcsB* 基因能够获得 *yycF*

基因缺陷菌株。在本研究中, 我们通过 JC 反选法用恒定表达的 *Pc* 启动子替代 *pcsB* 基因天然启动子, 构建无插入基因的 *pcsB* 组成型表达菌株  $\text{Pc-PcsB}^+$ , 使 *pcsB* 基因能在较高水平上恒定表达。在此基础上, 用红霉素抗性基因替代 *yycF* 基因获得 *yycF* 缺陷菌株  $\text{Pc-PcsB}^+\Delta\text{yycF}$ , 该菌株的获得有助于 *YycF* 蛋白对细菌毒力调控的确证性研究。

生长曲线测定结果显示  $\text{Pc-PcsB}^+$  的生长较  $\text{D39rpsl41}$  缓慢, 在 Ng 等<sup>[10]</sup>的研究中提到 *Pc* 启动子较天然启动子弱, 但我们通过在不同生长期间定量分析 *pcsB* 转录水平结果可以观察到, 插入的 *Pc* 启动子导致 *pcsB* 的转录水平较野生菌株恒定增加, 但 *pcsB* 转录水平的改变如何影响细菌的生长尚不清楚。缺失 *yycF* 基因后细菌生长显著减慢, 我们推测 *pcsB* 的恒定表达可能不能完全屏蔽 *yycF*

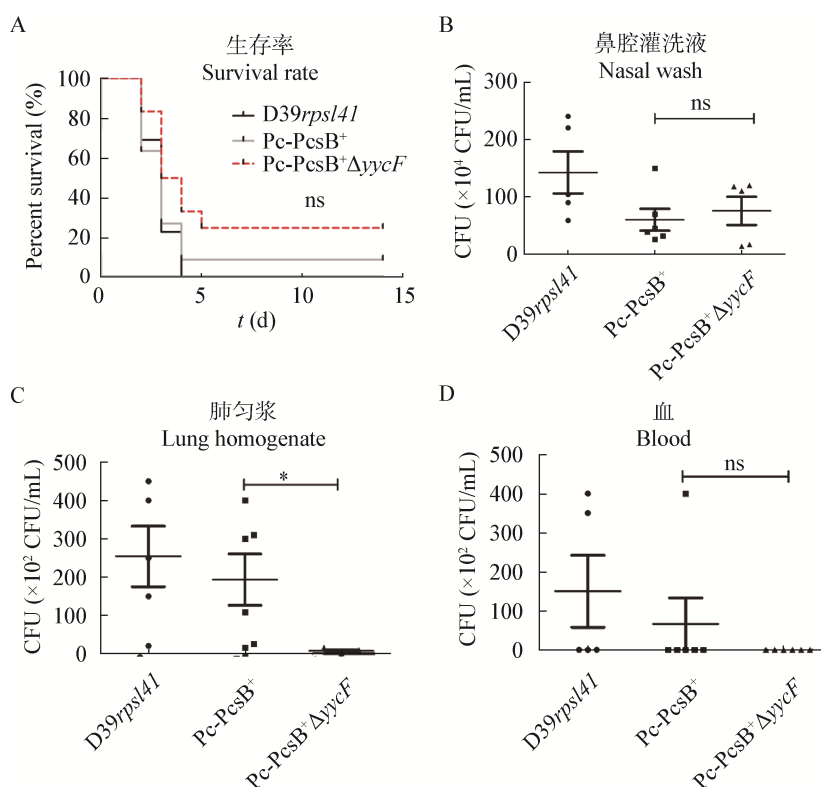


图 9 小鼠生存率和细菌定殖能力

Figure 9 Survival rates of mice and the bacterial ability of colonization

注: A: 小鼠肺炎模型的生存率; B-D: 鼻腔灌洗液, 肺匀浆和血液中的细菌载量. ns: 无统计学差异. \*:  $P<0.05$ .

Note: A: Survival rates of mice in pneumonia model; B-D: Bacteria number (CFU) in nasal wash, lung homogenate and blood. ns: No significance. \*:  $P<0.05$ .

基因对细菌生长的影响,但尚需实验进一步确定。革兰染色镜下观察, *Pc-PcsB<sup>+</sup>ΔyycF* 有明显的分裂异常,有研究显示, *YycF* 能够上调细胞分裂操纵子 *ftsAZ* 的表达,过表达 *yycF* 导致短小细胞的形成<sup>[25]</sup>。在本研究中,我们发现 *yycF* 缺失导致长链状梭状细胞的形成,该结果确证了 *YycF* 参与调控细菌的分裂,但其是否是通过正调控 *ftsAZ* 而实现的尚需进一步研究。

荚膜多糖是细菌生物膜主要的组成成分,能够保护细菌免受机体吞噬细胞的破坏,帮助病原体逃避宿主免疫<sup>[26-28]</sup>。荚膜多糖也是肺炎链球菌重要的毒力因子,无荚膜的肺炎链球菌基本无致病能力<sup>[29]</sup>。我们前期研究提示 *YycG* 可能参与荚膜多糖的合成调控<sup>[23]</sup>,为验证 *YycF* 是否参与荚膜多糖的合成调控,我们通过 ELISA 和 FITC-葡聚糖法检测细菌表面荚膜多糖含量,发现 *yycF* 缺陷菌株与 *Pc-PcsB<sup>+</sup>* 相比细菌表面的荚膜多糖没有显著差异,但 Western blot 发现 *yycF* 缺失后胞内荚膜多糖和小分子荚膜多糖条带增多。研究报道,肺炎链球菌荚膜多糖的合成分为前体的合成、重复单元的聚合、多聚物的翻转和最终定位几个阶段<sup>[26,30]</sup>。我们研究结果显示 *YycF* 影响胞内荚膜多糖合成和小分子荚膜多糖的调控,因此可以推测, *YycF* 参与的调节阶段可能为荚膜多糖前体的合成或重复单元的聚合过程,但其具体调控的靶基因目前尚不明确。

荚膜多糖的变化对细菌毒力有重要影响,当细菌表面的荚膜多糖减少时,细菌的粘附和入侵能力显著增强。但是,荚膜多糖减少也可能导致细菌逃避宿主免疫能力减弱从而降低肺炎链球菌的致病性<sup>[31-33]</sup>。体外抗吞噬实验显示 *yycF* 缺陷菌株抗吞噬能力没有显著差异,这与 *yycF* 缺陷后细菌表面的荚膜多糖含量无显著变化相一致,同时也可解释 *yycF* 缺陷菌株感染小鼠的死亡率并未增加的现象。但我们发现 *yycF* 缺陷菌株粘附到巨噬细胞表面的细菌数量较其亲本菌相比显著减少,推测可能与 *yycF* 缺陷后小分子的荚膜多糖增多相关,小分子荚膜多糖的增多可能导致细菌表面的负电荷增加,从

而导致 *yycF* 缺陷菌株粘附到巨噬细胞表面的细菌数量减少。

体外粘附侵袭实验中我们发现 *yycF* 缺陷菌株对 A549 细胞株的粘附能力减弱,但侵袭能力没有显著差异。体内毒力实验显示 *yycF* 缺陷菌株与其背景菌株 *Pc-PcsB<sup>+</sup>* 相比较,鼻腔灌洗液的细菌载量无显著差异,肺匀浆载量显著降低,这应该与缺陷菌株对粘附肺上皮细胞能力下调相关,在相同侵袭能力的情况下,细菌粘附减少,其进入肺和血的总量也就随之减少。

荚膜的增多会减少细菌的粘附,但除此之外还有很多因子参与细菌粘附的调控,如磷壁酸、*CbpA*、*PsaA*、*PspA* 等多种蛋白。我们研究发现 *yycF* 缺陷后小分子荚膜多糖增多,而有研究显示 *YycF* 可正调控 *PspA*<sup>[34]</sup>,那么 *YycF* 是通过对荚膜多糖和 *PspA* 的调控而影响细菌的粘附能力还是有其他因素参与呢?这尚需进一步研究。

综上所述,通过本研究成功构建了 *yycF* 缺陷菌株,确证了 *yycF* 缺陷影响细菌的生长和分裂,并且导致细菌粘附能力和肺部定殖能力减弱。同时,本研究提示 *YycF* 参与了肺炎链球菌荚膜多糖的合成调控,为后续探讨 *YycFG* 双组分系统对肺炎链球菌致病能力调控机制的研究奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Bogaert D, Hermans PWM, Adrian PV, et al. Pneumococcal vaccines: an update on current strategies[J]. Vaccine, 2004, 22(17/18): 2209-2220
- [2] Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, et al. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(4): 288-301
- [3] Balakrishnan I, Crook P, Morris R, et al. Early predictors of mortality in pneumococcal bacteraemia[J]. Journal of Infection, 2000, 40(3): 256-261
- [4] Henriques-Normark B, Normark S. Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host[J]. Experimental Cell Research, 2010, 316(8): 1408-1414
- [5] Musher DM. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment[J]. Clinical Infectious Diseases, 1992, 14(4): 801-809
- [6] Janoff EN, Rubins JB. Invasive pneumococcal disease in the immunocompromised host[J]. Microbial Drug Resistance,

- 1997, 3(3): 215-232
- [7] Johnston Jr RB. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia[J]. Reviews of Infectious Diseases, 1991, 13(S6): S509-S517
- [8] Hava DL, Camilli A. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors[J]. Molecular Microbiology, 2002, 45(5): 1389-1406
- [9] Lau GW, Haataja S, Lonetto M, et al. A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence[J]. Molecular Microbiology, 2001, 40(3): 555-571
- [10] Ng WL, Robertson GT, Kazmierczak KM, et al. Constitutive expression of PcsB suppresses the requirement for the essential VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae* R6[J]. Molecular Microbiology, 2003, 50(5): 1647-1663
- [11] Dubrac S, Bisicchia P, Devine KM, et al. A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway[J]. Molecular Microbiology, 2008, 70(6): 1307-1322
- [12] Throup JP, Koretke KK, Bryant AP, et al. A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Molecular Microbiology, 2000, 35(3): 566-576
- [13] Fabret C, Hoch JA. A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(23): 6375-6383
- [14] Martin PK, Li T, Sun DX, et al. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(12): 3666-3673
- [15] Eldakak A, Hulett FM. Cys303 in the histidine kinase PhoR is crucial for the phosphotransfer reaction in the PhoPR two-component system in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(2): 410-421
- [16] Ng WL, Tsui HCT, Winkler ME. Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(21): 7444-7459
- [17] Ng WL, Kazmierczak KM, Winkler ME. Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator[J]. Molecular Microbiology, 2004, 53(4): 1161-1175
- [18] Gutu AD, Wayne KJ, Sham LT, et al. Kinetic characterization of the WalRK<sub>Spn</sub> (VicRK) two-component system of *Streptococcus pneumoniae*: dependence of WalK<sub>Spn</sub> (VicK) phosphatase activity on its PAS domain[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(9): 2346-2358
- [19] Zheng Y, Zhang X, Wang X, et al. ComE, an essential response regulator, negatively regulates the expression of the capsular polysaccharide locus and attenuates the bacterial virulence in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 277
- [20] Martin B, Garcia P, Castanié MP, et al. The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction[J]. Molecular Microbiology, 1995, 15(2): 367-379
- [21] Lacks S, Hotchkiss RD. A study of the genetic material determining an enzyme activity in *Pneumococcus*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1960, 39(3): 508-518
- [22] Zhang JH. Study on FabT, a MARR family transcriptional regulator, regulation the biosynthesis of capsular polysaccharide and teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae*[D]. Master's Thesis of Chongqing Medical University, 2018 (in Chinese)  
张竞辉. MarR 型转录调控因子 FabT 对肺炎链球菌荚膜多糖和磷壁酸多糖生物合成的调控研究[D]. 重庆: 重庆医科大学硕士学位论文, 2018
- [23] Zhang S, Wang JM, Xu WC, et al. Antibacterial effects of Traditional Chinese Medicine monomers against *Streptococcus pneumoniae* via inhibiting pneumococcal histidine kinase (VicK)[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 479
- [24] Xayarath B, Yother J. Mutations blocking side chain assembly, polymerization, or transport of a wzy-dependent *Streptococcus pneumoniae* capsule are lethal in the absence of suppressor mutations and can affect polymer transfer to the cell wall[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(9): 3369-3381
- [25] Lange R, Wagner C, de Saizieu A, et al. Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Gene, 1999, 237(1): 223-234
- [26] Peterson PK, Wilkinson BJ, Kim Y, et al. Influence of encapsulation on staphylococcal opsonization and phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes[J]. Infection and Immunity, 1978, 19(3): 943-949
- [27] Yother J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation[J]. Annual Review of Microbiology, 2011, 65: 563-581
- [28] Wen ZS. Transcription and regulation mechanism of capsule genes in *Streptococcus pneumoniae*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Tsinghua University, 2016 (in Chinese)  
文镇宋. 肺炎链球菌荚膜基因转录及其调控机制的研究[D]. 北京: 清华大学博士学位论文, 2016
- [29] Geno KA, Gilbert GL, Song GY, et al. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 28(3): 871-899
- [30] Hardy GG, Caimano MJ, Yother J. Capsule biosynthesis and basic metabolism in *Streptococcus pneumoniae* are linked through the cellular phosphoglucomutase[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(7): 1854-1863
- [31] Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, et al. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(8): 4653-4667
- [32] Austrian R. Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention[J]. Reviews of Infectious Diseases, 1981, 3(Suppl 1): S1-S17
- [33] MacLeod CM, Krauss MR. Relation of virulence of pneumococcal strains for mice to the quantity of capsular polysaccharide formed *in vitro*[J]. Journal of Experimental Medicine, 1950, 92(1): 1-9
- [34] Avery OT, Dubos R. The protective action of a specific enzyme against type III pneumococcus infection in mice[J]. Journal of Experimental Medicine, 1931, 54(1): 73-89