

Host-Bacteria Interactions Methods and Protocols

宿主与细菌

的相互作用

[法] Annette C. Vergunst David O' Callaghan 编著

郑福英 陈启伟 宫晓炜 译

Host-Bacteria Interactions Methods and Protocols

宿主与细菌 的相互作用

[法] Annette C. Vergunst David O' Callaghan 编著

郑福英 陈启伟 宫晓炜 译

中国农业科学技术出版社

著作权合同登记号：01-2016-5751

图书在版编目 (CIP) 数据

宿主与细菌的相互作用 / (法) 安尼特·沃根斯特, (法) 大卫·奥卡拉汉编著; 郑福英, 陈启伟, 宫晓炜译. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2016. 12

ISBN 978-7-5116-2841-1

I. ①宿… II. ①安… ②大… ③郑… ④陈… ⑤宫… III. ①寄主-相互作用-细菌-研究 IV. ①Q18 ②Q939.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 275572 号

版权声明

Translation from the English language edition;

Host - Bacteria Interactions: Methods and Protocols

edited by Annette C. Vergunst and David O'Callaghan

Copyright © Springer Science + Business Media New York 2014

Humana Press is a brand of Springer

Springer is part of Springer Nature

All Rights Reserved

责任编辑 崔改泵

责任校对 杨丁庆

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82109194 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)

(010) 82109709 (读者服务部)

传 真 (010) 82106650

网 址 <http://www.castp.cn>

经销者 各地新华书店

印刷者 北京科信印刷有限公司

开 本 787mm × 1 092mm 1/16

印 张 20.75 彩页 48 面

字 数 492 千字

版 次 2016 年 12 月第 1 版 2016 年 12 月第 1 次印刷

定 价 80.00 元

中国农业科学院兰州兽医研究所 (LVRI)
家畜疾病病原生物学国家重点实验室 (SKL)
中国农业科学院科技创新工程
国家自然科学基金面上项目: 编号 31572532
国家自然科学基金青年项目: 编号 31602051、31602087

资助出版

《宿主与细菌的相互作用》

翻译人员

译 者：郑福英 陈启伟 宫晓炜

审 校：郑福英 陈启伟 宫晓炜

主译单位：中国农业科学院兰州兽医研究所

序 言

细菌感染是宿主和病原之间一种复杂的互作过程。在过去的 20 年中，通过细菌遗传学、细胞生物学、免疫学以及宿主生理学各学科知识的整合，我们对传染性疾病致病机理有了更深刻的认识；同时也引导了“细胞微生物学”这一新领域的发展。早期科研主要从研究较为充分的沙门氏菌、志贺氏菌、李氏杆菌及简单的细胞模型 HeLa 细胞开始。然而，这一领域的研究很快扩展到了其他病原菌及细胞系中。细胞微生物学有助于鉴定参与互作的细菌毒力因子和宿主靶标，以及这种互作是如何调节细胞并协助病原微生物的。最新的科研动态分别从细胞水平、组织水平及整体动物水平，对体内感染的病原生物进行了详尽的研究。

本书阐述了一系列研究宿主和细菌互作的最前沿的方法，覆盖哺乳动物、新型非哺乳动物感染模型、细胞生物学、组学及细菌遗传学。其目的就是提供一种技术途径，涉及细菌感染的病理生理学多方面操作技术，从动物整体水平到组织水平、细胞水平及分子水平。用于这些前沿技术的病原微生物很广泛，并非只是那些我们想试图阐明胞内感染机制的胞内寄生菌和兼性寄生菌。所以，每个章节介绍的操作技术可适用于大多数病原微生物。本书旨在为广大科研人员提供优化的实验操作步骤，以确保实验的成功；对实验方法部分，包括每一操作步骤进行了详尽的描述；而注释部分是实验操作人员亲自操作总结出来的实验心得和技巧，也是对实验方法的一个补充，可帮助大家更好地解决实验中出现的问题和困难。

早期的研究证明，感染模型可以帮助我们更好地认识传染病，而近些年，研究的焦点已从经典的哺乳动物、哺乳动物细胞模型转向无脊椎动物模型；本书第一篇的第一章和第二章介绍了感染模型小蜡螟幼虫和果蝇的运用；而在第二篇中介绍了非动物模型阿米巴原虫（第九章）及植物（第六章、第十一章）。斑马鱼是最新出现的一种感染动物模型，第三章介绍了研究人员利用斑马鱼遗传背景清晰及胚胎通体透明的特点，在感染后实时从细胞和动物水平评估宿主和病原体的互作。活体成像技术的进步促进了哺乳动物体内成像的发展，第四章介绍了使用高敏感度相机可以观察动物体内发光的细菌或细胞，而第五章介绍了双光子显微镜观察活体组织内细胞改变的相关内容。

为了全面认识细菌的毒力，从细胞和分子水平研究宿主和病原微生物的相互作用是必不可少的（第二篇）；通过植物和酵母细胞等一些替代模型，可以筛选和鉴定出在细菌分泌系统作用下发生易位的细菌蛋白和效应因子，并阐明细菌调控宿主防御系统以实现自身在体内繁殖的机制（第六章）；第七章介绍了当细菌毒力因子位于病原体表面或注入细胞内时，可以通过一种方法鉴定细菌毒力因子宿主靶位点的方法；同时也介绍了

一些病原菌是如何调控细胞关键流程的，包括蛋白通过蛋白酶体降解（第八章）、磷酸肌醇动力学（第九章）和细胞凋亡（第十章）；运用双分子互补技术，可以鉴定活体内相互作用的宿主和细菌蛋白。另外，本书还介绍了一种检测病原微生物通过 TLR 信号通路调节宿主先天性免疫途径的方法（第十二章）。

技术的进步引发了组学复杂数据的大爆炸（第三篇）。第十三章介绍果蝇细胞系可用于小 RNA 分子筛选，这有助于鉴定参与感染的宿主因子；第十四章介绍了如何从感染的细胞中纯化细菌，并用于蛋白质组和转录组分析；第十五章介绍了用流式细胞仪分选斑马鱼胚胎中吞噬细胞，并用于转录组的分析。本书还涉及了高通量蛋白质组学分析时样品的快速制备以及数据提取的方法（第十六章）；而这些研究所产生的大量数据，需要强大的生物信息学背景才能挖掘；第十七章介绍了细菌生物信息学资源中心（PATRIC），它是美国国立卫生研究院资助的数据库，致力于病原微生物的组学分析。

细菌病原体的遗传操作对阐明细菌与宿主互作的分子机制是至关重要的（第四篇）。本书的第十八章至第二十章介绍了调控专性细胞内寄生菌的技术。

在此要感谢所有为这本书做出贡献的科研人员，是他们推动这个领域的科研进步，并用他们专业的知识为大家提供了详尽的实验方案、操作步骤及实验心得。同时也非常感谢分子生物学部门的主编 John Walker 博士，感谢他给我们这次机会编著《宿主与细菌的相互作用》一书并给予的大力支持。

希望大家都能喜欢这本分子生物学著作。

Annette C. Vergunst

David O'Callaghan

于法国尼姆

（宫晓炜 译）

目 录

第一篇 通过感染模型研究细菌的毒力

第一章 用大蜡螟作为感染模型进行筛选	(3)
1 前言	(4)
2 材料	(5)
2.1 细菌菌株和昆虫	(5)
2.2 注射装置和设备	(5)
2.3 细菌生长和溶液的配制	(5)
3 研究方法	(6)
3.1 细菌准备	(6)
3.2 大蜡螟的准备和感染	(6)
注释	(7)
参考文献	(8)
第二章 肠道感染的动物模型——果蝇	(9)
1 前言	(10)
2 材料	(13)
2.1 果蝇的培养	(13)
2.2 果蝇的品系和处理	(13)
2.3 细菌培养	(14)
2.4 经口感染和生存分析	(14)
2.5 血淋巴中的细菌计数	(15)
2.6 吞噬作用的阻滞	(15)
2.7 肠道解剖	(15)
2.8 肠道固定	(15)
2.9 肠道免疫染色	(16)
2.10 将解剖后的肠道置于显微镜载玻片上, 并进行成像和数据分析	(16)
2.11 SYTOX Green 分析	(16)
2.12 Smurf 试验	(17)
2.13 RNA 提取	(17)
2.14 蛋白质提取	(17)

2. 15	BONCAT 方法监测整体的蛋白翻译	(18)
2. 16	监测 copper 细胞区域的酸化	(18)
3	方法	(18)
3. 1	经口感染	(18)
3. 2	生存分析	(19)
3. 3	果蝇体内全部的菌量	(19)
3. 4	血淋巴中的细菌计数	(19)
3. 5	肠上皮内的细菌数	(20)
3. 6	吞噬作用的阻滞	(20)
3. 7	肠道解剖	(20)
3. 8	肠道的封闭和免疫染色	(21)
3. 9	肠道组织涂片	(21)
3. 10	SYTOX Green 方法检测上皮的完整性	(22)
3. 11	Smurf 试验检测消化道的完整性	(22)
3. 12	从成年果蝇的中肠提取 RNA	(22)
3. 13	从解剖的肠道中提取蛋白质	(23)
3. 14	通过 BONCAT 方法监测蛋白质的合成	(23)
3. 15	监测果蝇中肠泌酸区域的生理功能	(23)
	注释	(24)
	致谢	(28)
	参考文献	(28)
第三章	斑马鱼胚胎作为动物模型研究细菌毒力	(32)
1	前言	(33)
1. 1	显微注射	(34)
2	材料	(34)
2. 1	取卵并准备注射	(34)
2. 2	细菌培养和培养液的准备	(35)
2. 3	显微注射	(35)
2. 4	细菌增殖的分析	(35)
2. 5	生存分析和活体成像的工具	(36)
2. 6	qRT-PCR 和 RNA-Seq 分析	(36)
3	方法	(36)
3. 1	获取鱼卵并准备感染实验的胚胎	(36)
3. 2	培养洋葱伯克氏菌用于感染及接种液的准备	(37)
3. 3	显微注射	(37)
3. 4	胚胎生存研究	(38)
3. 5	测定细菌增殖解读细菌的毒力	(38)
3. 6	在感染期的实时观测	(39)



3.7 提取 RNA 用于 qRT-PCR 和 RNA 序列的分析	(39)
3.8 qRT-PCR 的分析	(39)
注释	(40)
致谢	(47)
参考文献	(47)
第四章 研究小鼠活体内宿主和病原的相互作用并通过实时生物光子成像 进行可视化观察	(50)
1 前言	(51)
1.1 生物荧光标记病原菌的可视化	(51)
1.2 用急性毒性布鲁氏菌感染小鼠模型	(51)
1.3 慢性毒力布鲁氏菌感染小鼠模型	(52)
1.4 用突变型布鲁氏菌感染小鼠模型	(52)
1.5 评价候选的疫苗	(53)
1.6 宿主糖、赤藓糖醇及布鲁氏菌感染的作用	(53)
2 材料	(54)
2.1 羊布鲁氏菌	(54)
2.2 抗生素	(54)
2.3 质粒和转座子的准备	(54)
2.4 用于老鼠安乐死的设备	(55)
2.5 用于羊布鲁氏菌电穿孔的设备和培养基	(55)
2.6 老鼠模型和感染	(55)
2.7 CCD 成像	(55)
2.8 赤藓糖醇运输实验	(56)
3 方法	(56)
3.1 构建发生物荧光的布鲁氏菌	(56)
3.2 感染老鼠	(57)
3.3 生物发光成像技术监测老鼠的感染状况	(57)
3.4 组织的离体成像	(57)
3.5 赤藓糖醇运输实验	(57)
注释	(58)
致谢	(60)
参考文献	(60)
第五章 基于活体双光子成像技术的哺乳动物细菌感染研究	(63)
1 前言	(64)
2 材料	(66)
2.1 细菌及培养条件	(66)
2.2 荧光团——共轭右旋糖酐	(66)
2.3 通过显微注射诱导感染	(66)

3 方法 (67)

3.1 术前准备及细菌的培养 (67)

3.2 实验动物的术前准备 (68)

3.3 大鼠的外科手术以及细菌浸液（输液） (68)

3.4 成像过程 (69)

3.5 后成像过程 (70)

注释 (70)

致谢 (72)

参考文献 (72)

第二篇 宿主与细菌在细胞层面的相互作用

第六章 Cre 报告基因分析易位（CRAFT）：一种用于研究宿主细胞内蛋白转运的工具 (77)

1 前言 (78)

2 材料 (79)

2.1 细菌菌株、Cre 质粒构建、转基因报告宿主 (79)

2.2 农杆菌属培养基储液 (79)

2.3 农杆菌的生长 (80)

2.4 平板培养基的储备液 (80)

2.5 植物培养和根基的转换 (81)

2.6 用于酵母培养基的储备溶液 (82)

2.7 酵母生长和转换 (82)

3 方法 (83)

3.1 植物测定 (83)

3.2 酵母测评 (84)

注释 (85)

参考文献 (89)

第七章 宿主与细菌蛋白间相互关系的检测：真核核仁蛋白与弗朗西斯菌属延长因子 Tu 的相互作用 (92)

1 前言 (93)

2 材料 (93)

2.1 用土拉热杆菌感染人体细胞 (93)

2.2 LVS 亚细胞分离的准备 (94)

2.3 免疫印迹法 (94)

2.4 荧光实验 (95)

2.5 抗体和多肽 (95)

2.6 琼脂糖珠 (95)



3 方法	(96)
3.1 核仁蛋白肽可降低 LVS 与人类细胞的相互作用	(96)
3.2 核仁蛋白肽可降低 LVS 对人类细胞的感染	(96)
3.3 Anti - EF - Tu 抗体降低 LVS 与人类细胞上的相互作用	(97)
3.4 Anti - EF - Tu 可以降低 LVS 对人类细胞的感染	(97)
3.5 用生物素—亲和素珠进行 pull down 试验	(98)
3.6 用 GST 琼脂糖珠进行 Pull - down 试验	(99)
3.7 共聚焦显微镜	(99)
注释	(100)
参考文献	(101)
第八章 劫持宿主蛋白酶体以时序性降解细菌效应蛋白	(104)
1 前言	(105)
1.1 背景	(105)
1.2 方法概述	(106)
2 材料	(107)
2.1 体外泛素连接酶试验	(107)
2.2 分离被军团杆菌感染的细胞并用于检测泛素化效应蛋白	(108)
2.3 在军团菌感染细胞中检测泛素化蛋白的降解。	(108)
3 方法	(109)
3.1 泛素连接酶的体内测定	(109)
3.2 分离被军团杆菌感染的细胞以检测泛素化的效应蛋白	(109)
3.3 军团菌感染细胞内的泛素化蛋白降解检测	(110)
注释	(111)
致谢	(112)
参考文献	(112)
第九章 军团杆菌感染期磷酸肌醇动力学活细胞成像	(114)
1 前言	(115)
1.1 嗜肺军团杆菌破坏磷脂酰肌醇脂质	(115)
1.2 阿米巴盘基网柄菌做为一种军团杆菌的感染模型	(116)
1.3 LCV PI 模型的活细胞成像分析	(116)
2 材料	(117)
2.1 嗜肺军团菌	(117)
2.2 盘基网柄菌	(118)
2.3 显微镜检查	(118)
3 方法	(119)
3.1 用于感染的嗜肺军团菌的培养	(119)
3.2 盘基网柄菌培养	(119)
3.3 转化盘基网柄菌用来表达荧光探针	(119)

3.4	接种盘基网柄菌用于感染和显微观察	(120)
3.5	快速感染过程中的实时成像	(120)
3.6	动态感染过程中的实时观察	(121)
	注释	(121)
	致谢	(123)
	参考文献	(123)
第十章	细菌蛋白干扰细胞凋亡的研究	(126)
1	前言	(127)
2	材料	(127)
2.1	培养物	(127)
2.2	培养基和材料	(128)
2.3	免疫标记	(129)
2.4	质粒	(129)
2.5	其他试剂及设备	(129)
3	方法	(131)
3.1	被感染细胞的免疫标记	(131)
3.2	转染	(132)
3.3	诱导细胞凋亡	(132)
3.4	诱导凋亡细胞的免疫染色	(133)
3.5	PARP 裂解分析	(133)
3.6	转化酵母细胞中 Ats - 1 的定位	(134)
3.7	Ats - 1 使酵母细胞避免由 Bax 诱导引起的生长停滞	(135)
3.8	Bax 转化至酵母线粒体的过程分析	(135)
	注释	(137)
	参考文献	(138)
第十一章	基于双分子荧光互补技术研究植物宿主内的微生物病原体蛋白质 互作成像	(140)
1	前言	(141)
2	材料	(142)
3	方法	(147)
3.1	使用 pSAT - 衍生的植物 BiFC 载体进行克隆	(147)
3.2	制备烟草 BY - 2 原生质体	(148)
3.3	PEG 介导 BY - 2 原生质体的转染	(148)
3.4	获得荧光图像	(149)
3.5	先进的 BiFC 技术和问题排除	(149)
	注释	(149)
	致谢	(154)
	参考文献	(154)



第十二章 细菌感染小鼠树突状细胞的 TLR 信号应答研究	(157)
1 前言	(158)
2 材料	(159)
2.1 准备 BMDCs	(159)
2.2 BMDCs 感染	(160)
2.3 树突状细胞的活化和 TLR 应答分析	(160)
3 方法	(162)
3.1 BMDCs 准备	(162)
3.2 细菌感染骨髓树突状细胞	(163)
3.3 树突状细胞活化和 Toll 样受体免疫应答分析	(163)
注释	(165)
参考文献	(168)

第三篇 组学与大规模筛查

第十三章 利用果蝇细胞 siRNA 筛选鉴定宿主感染所需的因素	(173)
1 前言	(174)
2 材料	(175)
2.1 菌株和细胞	(175)
2.2 培养基和抗生素	(175)
2.3 抗体/染料/试剂	(176)
2.4 显微镜	(176)
2.5 药物	(176)
2.6 溶液和试剂	(177)
2.7 设备	(177)
3 方法	(177)
3.1 细菌培养	(177)
3.2 细胞培养	(177)
3.3 布鲁氏菌感染, 药物治疗及庆大霉素保护实验	(178)
3.4 感染宿主 S2 细胞的活力分析	(178)
3.5 对亚细胞标记的感染果蝇 S2 细胞进行表达分析	(179)
3.6 免疫荧光显微镜分析	(179)
3.7 药物治疗	(179)
3.8 dsRNAs 的生成	(180)
3.9 RNAi 介导的基因敲除与分析	(180)
3.10 小鼠胚胎成纤维细胞感染	(181)
3.11 统计分析	(181)
注释	(181)

参考文献	(184)
第十四章 胞内细菌的纯化：从宿主细胞中分离有活性的流产布鲁氏菌	(186)
1 前言	(187)
2 材料	(187)
2.1 细胞培养和感染	(188)
2.2 胞内细菌的纯化	(188)
2.3 细菌的免疫检测	(189)
2.4 免疫印迹分析	(190)
2.5 RNA 转录的检测	(190)
3 方法	(191)
3.1 细胞培养和细菌接种准备	(191)
3.2 感染	(191)
3.3 胞内细菌的提取和纯化	(192)
3.4 纯化细菌的免疫检测	(192)
3.5 纯化细菌的免疫印迹分析	(193)
3.6 检测纯化细菌的 RNA 转录	(193)
注释	(194)
致谢	(196)
参考文献	(196)
第十五章 对斑马鱼感染模型流式细胞分选 (FACS - Sorted) 免疫细胞群 RNA 测序以识别细胞对细胞内病原体的特异性反应	(198)
1 前言	(199)
2 材料	(200)
2.1 细胞分离和 FACS 分选组成	(200)
2.2 RNA 提取和文库制备	(200)
3 方法	(201)
3.1 细胞分离和 FACS 分选	(201)
3.2 RNA 提取，文库制备和 RNA 测序	(201)
3.3 数据分析和质量评估	(202)
注释	(203)
致谢	(205)
参考文献	(205)
第十六章 细菌高通量鸟枪蛋白质组学分析的捷径	(209)
1 前言	(210)
2 材料	(210)
2.1 获得细菌培养物	(210)
2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE)	(211)
2.3 蛋白质的还原，烷基化和消化	(211)



2.4	nanoLC – MS/MS	(212)
2.5	鉴定	(212)
2.6	定量	(212)
3	方法	(212)
3.1	获得细菌培养物	(212)
3.2	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS – PAGE)	(212)
3.3	蛋白质还原, 烷基化和消化	(213)
3.4	nanoLC – MS/MS	(213)
3.5	鉴定	(214)
3.6	定量	(214)
	注释	(214)
	致谢	(216)
	参考文献	(216)
第十七章	PATRIC 生物信息学资源中心的比较基因组分析	(218)
1	前言	(219)
2	材料	(220)
3	方法	(221)
3.1	搜索目的基因	(221)
3.2	搜索目的基因组并进行组别归纳以进行比较分析	(222)
3.3	比较基因组学: 利用蛋白质家族分类检查 Pan 蛋白质组	(224)
3.4	比较代谢组学: 检查多个基因组的代谢途径	(227)
	致谢	(229)
	参考文献	(229)

第四篇 难治性细菌的研究方法

第十八章	洋葱伯克霍尔德菌及其他多重耐药革兰氏阴性菌的基因 无标记敲除方法	(233)
1	前言	(234)
2	材料	(235)
2.1	生长培养基、抗生素、化学试剂	(235)
2.2	细菌菌株	(235)
2.3	核酸序列	(236)
2.4	DNA 载体	(236)
2.5	引物	(236)
2.6	分子克隆所涉及的酶, 试剂盒和材料	(237)
3	方法	(238)
3.1	缺失质粒的构建 (pDelatsR)	(238)

3.2 缺失质粒结合导入伯克霍尔德菌	(239)
3.4 互补质粒结合导入伯克霍尔德菌	(241)
注释	(241)
致谢	(243)
参考文献	(243)
第十九章 在贝氏柯克斯体中的基因失活	(246)
1 前言	(247)
2 材料	(248)
2.1 自杀质粒的构建	(248)
2.2 贝氏柯克斯体的转化与缺失突变体的筛选	(248)
2.3 贝氏柯克斯体基因敲除分析	(249)
3 方法	(249)
3.1 特异性基因自杀质粒的构建	(249)
3.2 贝氏柯克斯体的转化	(251)
3.3 通过 PCR 鉴定初级整合子	(251)
3.4 基因缺失菌株的蔗糖筛选	(252)
3.5 通过 PCR 鉴定基因缺失	(252)
3.6 缺失突变体的克隆	(252)
3.7 GOI 缺失的验证	(253)
注释	(253)
致谢	(255)
参考文献	(255)
第二十章 鉴定细胞内病原沙眼衣原体毒力因子的一种化学诱变方法	(257)
1 前言	(258)
2 材料	(258)
2.1 细菌和细胞培养	(258)
2.2 化学诱变	(259)
2.3 菌斑纯化	(259)
2.4 全基因组测序	(259)
2.5 设备	(260)
3 方法	(260)
3.1 化学诱变	(260)
3.2 通过菌斑克隆纯化分离衣原体突变株	(260)
3.3 全基因组测序筛选衣原体突变株	(261)
3.4 产生衣原体重组子	(262)
注释	(263)
参考文献	(264)
附图	(267)