

## II 型猪链球菌二元信号转导系统 2148hk/rr 基因敲除突变体的构建

程 功<sup>1,2</sup> 李 明<sup>2</sup> 郑 峰<sup>2</sup> 王 晶<sup>2</sup> 王长军<sup>2</sup> 潘秀珍<sup>2</sup> 范红结<sup>1\*</sup> 唐家琪<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院 南京 210095)

(2. 南京军区军事医学研究所 南京 210002)

**摘 要:** 构建猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* type 2)强毒株 05ZYH33 二元信号转导系统 2148hk/rr 基因敲除突变体。构建中间为壮观霉素抗性基因, 两侧为 2148hk/rr 编码基因上、下游同源序列的基因敲除质粒, 通过同源重组筛选 2148hk/rr 编码基因敲除突变体。PCR 分析和 Southern 杂交结果均显示 2148hk/rr 编码基因完全被壮观霉素抗性基因替代, 基因敲除突变体构建成功。筛选获得 05ZYH33 二元信号转导系统 2148hk/rr 基因敲除突变体, 为阐明该调控系统在猪链球菌致病过程中的作用奠定了基础。

**关键词:** 猪链球菌 2 型, 二元信号转导系统, 基因敲除, 突变体

## Development of the 2148hk/rr Gene Knock-out Mutant of *Streptococcus suis* Type 2

CHENG Gong<sup>1,2</sup> LI Ming<sup>2</sup> ZHENG Feng<sup>2</sup> WANG Jing<sup>2</sup> WANG Chang-Jun<sup>2</sup>  
PAN Xiu-Zhen<sup>2</sup> FAN Hong-Jie<sup>1\*</sup> TANG Jia-Qi<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

(2. Institute of Military Medical Sciences, Nanjing Command, Nanjing 210002)

**Abstract:** To construct gene knock-out mutant of a two-component signal transduction system named 2148hk/rr in *Streptococcus suis* type 2 virulent strain 05ZYH33. Recombinant gene knock-out vector was constructed consisting of *Spc<sup>r</sup>* cassette with flanking homology regions to the target genes, the isogenic 2148hk/rr-deficient mutant was screened by allelic replacement. PCR analysis and Southern hybridization confirmed that the coding genes of 2148hk/rr were replaced completely by *spc<sup>r</sup>* cassette. Conclusion The mutant of 05ZYH33 2148hk/rr system was successfully constructed, which laid the foundation for farther research on the role of this two-component signal transduction system during infection.

**Keywords:** *Streptococcus suis* type 2, Two-component signal transduction system, Gene knock-out, Mutant

基金项目: 国家 863 项目(No. 2006AA02Z455); 国家自然科学基金资助项目(No. 30730081, No. 30600533, No.30670105);  
江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2006014, No. BK2007013)

\* 通讯作者: 范红结 Tel: 025-84395328; ✉: fhj-68@sohu.com; 唐家琪 Tel: 025-84526002; ✉: tjq85@hotmail.com  
收稿日期: 2007-05-09; 接受日期: 2007-06-22

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1998 年和 2005 年,我国江苏省和四川省分别发生两起猪链球菌病暴发流行感染猪和人的公共卫生事件,感染者出现了链球菌中毒性休克综合征(Streptococcal toxic shock syndrome, STSS)<sup>[1]</sup>。为了对造成这两次公共卫生事件的猪链球菌(*Streptococcus suis*, *S. suis*)2 型流行菌株的致病性进行深入研究,本室(南京军区军事医学研究所)对 1998 年江苏流行的强致病株 98HAH12、2005 年四川流行的强致病株 05ZYH33(两株均分离自 STSS 病人)及无毒株 05HAS68(分离自江苏健康猪)进行了全基因组测序,并对基因组进行了注释<sup>[2]</sup>。大量研究表明,二元信号转导系统(two-component signal transduction systems, TCSTS)在致病菌感染宿主的过程中能调控多种毒力因子的表达以完成其致病过程<sup>[3]</sup>。基因组注释结果显示,05ZYH33 中存在 15 个 TCSTS<sup>[2]</sup>。本研究选择其中的一个 TCSTS,根据其编码基因所在阅读框的位置将其命名为 2148hk/rr, 同源性比对发现,该调控系统与产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)VirR/S 氨基酸序列一致性(identities)为 30%。VirR/S 可从转录水平直接或间接调控产气荚膜梭菌多种毒力因子的表达<sup>[4~5]</sup>。本研究以强致病株 05ZYH33 为对象,通过同源重组方法获得了 2148hk/rr 基因敲除突变体,为阐明该调控系统在猪链球菌致病过程中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及引物

本实验所用的菌株、质粒及引物见表 1,引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。

1.2 主要试剂和仪器

Ex Taq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均为 TaKaRa 公司产品;质粒 DNA 抽提试剂盒及胶回收试剂盒为 Promega 公司产品;Todd-Hewitt Broth (THB) 培养基购于 Difco 公司;North2South DNA 随机引物生物素标记和化学发光检测试剂盒为 Pierce 公司产品。Gene Pulser Xcell™ 型电穿孔仪为 BIO-RAD 公司产品;Ultrospec2000 型紫外分光光度计为 Pharmacia 公司产品。

1.3 05ZYH33 2148hk/rr 基因敲除突变株的构建和鉴定

1.3.1 基因敲除质粒的构建:以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板,分别用引物 L1/L2、R1/R2 进行 PCR,扩增 2148hk/rr 的上、下游片段 L 和 R;同时以 pSET2 质粒为模板,用引物 Spc1/Spc2 进行 PCR,扩增壮观霉素抗性基因(*spc<sup>r</sup>* cassette)。在限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶的作用下,将它们依次克隆到 pUC18 载体的 *Eco*RI、*Bam*HI、*Pst*I 和 *Hind*III 4 个多克隆位点上,形成一个 *spc<sup>r</sup>* 基因两侧具有与 2148hk/rr 上

表 1 实验所用的菌株、质粒及引物  
Table 1 Bacterial strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒及引物	表型及相关特征	来源
菌株		
05ZYH33	血清型 2 型, 强致病株, 2148hk/rr <sup>+</sup>	本室保存
Δ05ZYH33	血清型 2 型, <i>Spc<sup>r</sup></i> , 2148hk/rr <sup>-</sup>	本研究构建
mutant1	血清型 2 型, <i>Spc<sup>r</sup></i> , <i>Amp<sup>r</sup></i> , 2148hk/rr <sup>+</sup>	本研究构建
<i>E.coli</i> DH5α	<i>deoR</i> , <i>recA</i> , <i>endA</i> , <i>hsdR</i> , <i>supE</i> , <i>thi</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA</i>	本室保存
质粒		
pMD-18T	T 载体, <i>lacZ</i> , <i>Amp<sup>r</sup></i>	TaKaRa
pUC18	<i>E. coli</i> 克隆载体, <i>lacZ</i> , <i>Amp<sup>r</sup></i>	本室保存
pSET2	<i>E. coli</i> - <i>S. suis</i> 穿梭质粒, <i>Spc<sup>r</sup></i>	Takamatsu <i>et al.</i> (2001)
pUC18-2148hk/rr	2148hk/rr 基因敲除质粒, <i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>Spc<sup>r</sup></i>	本研究构建
引物		
L1	GAATTCAGATTCTTCGCGTTTGTTA (下划线为引入的 <i>Eco</i> RI 酶切位点)	
L2	GGATCCGCACCCCTTTATTTCTAT (下划线为引入的 <i>Bam</i> HI 酶切位点)	
R1	CTGCAGAGGCGGGATTCTTTCT (下划线为引入的 <i>Pst</i> I 酶切位点)	
R2	AAGCTTAACCATGATATTGCCAGTG (下划线为引入的 <i>Hind</i> III 酶切位点)	
Spc1	GGATCCGTTTCGTGAATACATGTTATA (下划线为引入的 <i>Bam</i> HI 酶切位点)	
Spc2	CTGCAGGTTTTCTAAAATCTGAT (下划线为引入的 <i>Pst</i> I 酶切位点)	
IN1	TACCCGATAGCCAAGAGAAGCAAAGT	
IN2	CCAAGAAATCGAACGGAACAAACAT	
OUT1	ACCACCAATCCAAAGAGCAGCATC	
OUT2	TACGTTATGGAAAAGAGCGGATGG	

下游同源序列的基因敲除质粒 pUC18-2148hk/rr, 如图 1 所示。

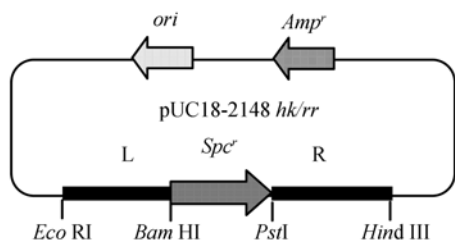


图 1 2148hk/rr 基因敲除质粒构建示意图

Fig. 1 Construction of gene knock-out plasmid pUC18-2148hk/rr

**1.3.2 基因敲除突变体的筛选和鉴定:** 参照 Smith 等<sup>[6]</sup>的方法制备 05ZYH33 感受态细菌。在 22.5 kV/cm、500  $\Omega$  和 25  $\mu$ F 电转参数下, 用构建好的基因敲除质粒 pUC18-2148hk/rr 电转化感受态细菌, 电转后将菌液涂布于 THB 平板(含 100  $\mu$ g/mL 壮观霉素), 37  $^{\circ}$ C 培养 48 h 后, 挑取所有的单菌落进行增菌培养并取菌液 2  $\mu$ L 作模板, 用引物 IN1/IN2(位于 2148hk/rr 内部)进行 PCR 初步筛选, 对疑似阳性菌采用 PCR 和 Southern 杂交验证。

## 2 结果

### 2.1 05ZYH33 2148hk/rr 基因敲除突变株的构建和鉴定

**2.1.1 2148hk/rr 基因敲除质粒的构建:** 以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 用引物 L1/L2、R1/R2 成功扩增出 2148hk/rr 的上游片段 L(957 bp)和下游片段 R(970 bp), 同时用引物 Spc1/Spc2 从 pSET2 质粒中扩增出 spc<sup>r</sup> 基因(1130 bp)。将这三个片段分别装入 T 载体后, 根据引入的相应酶切位点, 在限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶的作用下, 将它们依次连接到 pUC18 载体的 EcoRI、BamHI、PstI 和 HindIII 4 个多克隆位点上, 形成基因敲除质粒 pUC18-2148hk/rr。对构建好的重组质粒进行 PCR 及双酶切验证, 结果见图 2、图 3, 对重组质粒进行测序, 结果均显示 3 个片段连接次序正确, 重组质粒构建成功。

**2.1.2 2148hk/rr 编码基因敲除突变株的筛选:** 取 5  $\mu$ L 基因敲除质粒 pUC18-2148hk/rr 电转化 05ZYH33 感受态细菌, 转化平板经 37  $^{\circ}$ C 培养 48 h 后, 从平板挑取单菌落摇菌培养, 使用引物 IN1/IN2 进行菌液 PCR。由于引物 IN1/IN2 位于 2148hk/rr 内部(产物大小 588 bp), 如果 2148hk/rr 被敲除, PCR 扩增应呈阴性结果, 否则说明 2148hk/rr 未被敲掉。通过上述筛选方法, 在一组菌液 PCR 中, 发现两株扩增结果为阴性(图 4 泳道 3, 7), 挑出第 7 泳道对应的菌

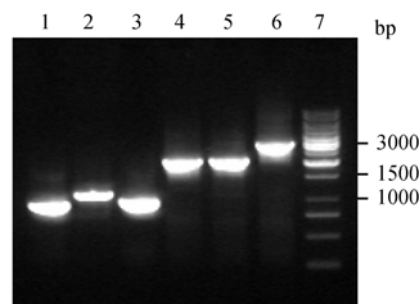


图 2 PCR 扩增产物凝胶电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR products

1: PCR products with L1, L2; 2: PCR products with Spc1, Spc2; 3: PCR products with R1, R2; 4: PCR products with L1, Spc2; 5: PCR products with Spc1, R2; 6: PCR products with L1, R2; 7: 1 kb DNA ladder marker

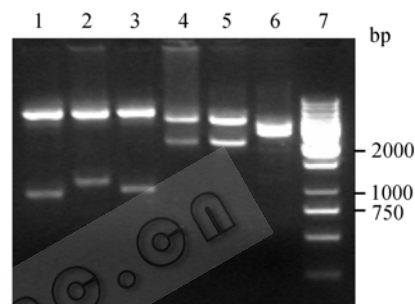


图 3 基因敲除质粒 pUC18-2148hk/rr 的双酶切鉴定

Fig. 3 Restriction analysis of plasmid pUC18-2148hk/rr

1: pUC18-2148hk/rr digested by EcoRI and BamHI; 2: pUC18-2148hk/rr digested by BamHI and PstI; 3: pUC18-2148hk/rr digested by PstI and HindIII; 4: pUC18-2148hk/rr digested by EcoRI and PstI; 5: pUC18-2148hk/rr digested by BamHI and HindIII; 6: pUC18-2148hk/rr digested by EcoRI and HindIII; 7: 1 kb DNA ladder marker

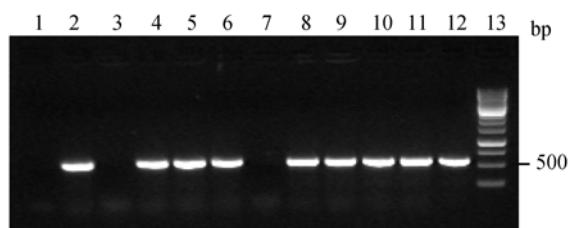


图 4 2148hk/rr 基因敲除突变体的部分 PCR 初步筛选结果

Fig. 4 Preliminary PCR screening of gene knock-out mutant of 2148hk/rr

1: Negative control; 2: Mutant 1; 3: Mutant 2; 4: Mutant 3; 5: Mutant 4; 6: Mutant 5; 7: Mutant 6; 8: Mutant 7; 9: Mutant 8; 10: Mutant 9; 11: Mutant 10; 12: Positive control; 13: 1 kb DNA ladder marker.

株 mutant6, 重命名为  $\Delta$ 05ZYH33, 作进一步验证。

另外, 取 mutant1 作为单向插入对照。

**2.1.3 2148hk/rr 基因敲除突变体  $\Delta$ 05ZYH33 的 PCR 鉴定:** 分别于 2148hk/rr 上、下游片段 L 和 R 的两侧再设计一对引物 OUT1/OUT2, 引物的位置如图 5A 所示。如果发生等位基因置换, spc<sup>r</sup> 基因将取代 2148hk/rr, 用引物 OUT1/Spc2 进行 PCR 能够扩增出 2087 bp 的片段, 用引物 Spc1/OUT2 PCR 能扩增出

2100bp的片段, 用引物Spc1/Spc2 进行PCR能扩增出 *spc'*基因, 而在 05ZYH33 中, 用以上引物进行PCR 都应得到阴性结果。而原来以 05ZYH33 基因组为模

板, 用引物IN1/IN2 能扩增出 588bp的目的片段, 在 突变株中将不复存在。结果各PCR产物的大小与理论值相符(图 5B)。

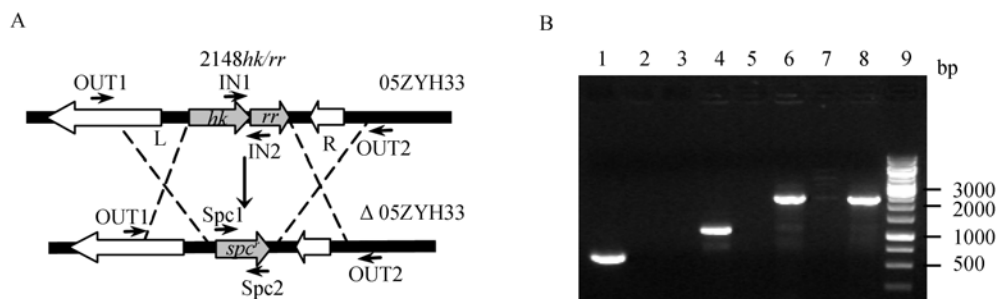


图 5 2148hk/rr 基因敲除突变体 Δ05ZYH33 的 PCR 验证

Fig. 5 PCR identification of 2148hk/rr gene knock-out mutant Δ05ZYH33

1: IN1/IN2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template; 2: IN1/IN2 PCR amplification using Δ05ZYH33 genomic DNA as template; 3: Spc1/Spc2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template; 4: Spc1/ Spc2 PCR amplification using Δ05ZYH33 genomic DNA as template; 5: OUT1/Spc2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template; 6: OUT1/Spc2 PCR amplification using Δ05ZYH33 genomic DNA as template; 7: Spc1/OUT2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template; 8: Spc1/OUT2 PCR amplification using Δ05ZYH33 genomic DNA as template; 9: 1kb DNA ladder marker

**2.1.4 2148hk/rr 基因敲除突变体 Δ05ZYH33 的 Southern 杂交鉴定:** 为进一步验证 Δ05ZYH33 的正确性, 通过 Southern 杂交对 Δ05ZYH33 基因组上的突变基因进行定位分析。实验验证探针为 2148hk/rr 中间片段(引物 IN1/IN2 的 PCR 产物), 采用随机引物法进行生物素标记, 操作参照试剂盒说明书。将各基因组 DNA 用 *EcoRI* 酶切过夜后, 电泳分离各片段(0.8% 琼脂糖凝胶), 采用毛细管法将凝胶中的 DNA 转印至尼龙膜, 80 °C 烘烤 2h 固定 DNA。从预杂交开始到最后的曝光均严格按照说明书上的操作步骤进行。结果如图 6 所示, 在 05ZYH33 和 mutant1 基因组酶切产物中, 10kb 附近均出现了一条 2148hk/rr 探针杂交条带, 与预计酶切片段大小 9.8kb 相符, 而在 Δ05ZYH33 中则未出现杂交条带, 表明 2148hk/rr 已被敲除。

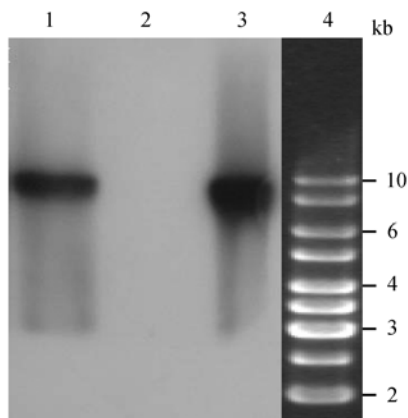


图 6 突变体 Δ05ZYH33 的 Southern 杂交分析

Fig. 6 Southern blot analysis of the mutant Δ05ZYH33

1: 05ZYH33 genome/ *EcoRI*; 2: Δ05ZYH33 genome/ *EcoRI*; 3: Mutant1 genome/ *EcoRI*; 4: 1kb DNA ladder marker

### 3 讨论

猪链球菌荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)是该致病菌唯一明确的毒力因子, 通过基因敲除及转座子插入等方式获得的荚膜合成缺陷株的毒力完全丧失<sup>[7-8]</sup>。溶菌酶释放蛋白(muramidase-released protein, MRP)及胞外因子(extra-cellular factors, EF)作为主要毒力相关因子, 与部分区域猪链球菌毒力强弱存在一定的相关性, 但这些蛋白编码基因敲除后细菌的毒力并未降低, 且部分国家或地区的绝大部分致病菌株并不携带这两种蛋白因子<sup>[9-11]</sup>。目前, 猪链球菌致病的具体机制仍不清楚。

二元信号转导系统(TCSTS)是在细菌中普遍存在的一种跨膜信号传导系统, 由组氨酸激酶(histidine kinase, HK)及其相邻的反应调节因子(response regulator, RR)组成, 在细菌感受外界环境变化并做出适应性反应的过程中起着非常关键的作用<sup>[12]</sup>。大量研究表明, TCSTS广泛参与病原菌的信号传递及毒力因子表达调控过程, 在细菌致病过程中发挥着重要作用<sup>[13]</sup>。

2002 年, de Greeff 等<sup>[14]</sup>报道了其中的一个“孤儿”反应调节因子 RevS, 动物实验结果表明, *revS* 基因敲除后的突变株毒力明显降低, 此后未见有关 *S. suis* 2 型 TCSTS 的研究报道。通过序列比对发现, 除 RevS 外, 05ZYH33 中仍有几个 TCSTS 与其它病原菌毒力调控相关 TCSTS 存在较高的同源性, 如 1359hk/rr 与肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*) VicR/K 同源性较高, 氨基酸序列一致性为 81%。

VicR/K 可调控一些毒力因子如肺炎球菌表面蛋白 A (pneumococcal surface protein A, PspA) 的表达<sup>[15]</sup>; 1732rr 为“孤儿”反应调控因子, 其氨基酸序列与化脓链球菌 CsrR 一致性为 46%, CsrR/S (CovR/S) 负向调控化脓链球菌几个毒力因子如透明质酸荚膜 (Hyaluronic Acid Capsule), 链球菌溶素 S (Streptolysin S) 及化脓性外毒素 B (Pyrogenic Exotoxin B) 的表达<sup>[16]</sup>; 2148hk/rr 与产气荚膜梭菌 VirR/S 氨基酸序列存在一定的同源性, VirR/S 可从全局调控其主要毒力因子如磷脂酶 C (phospholipase C)、产气荚膜梭菌溶血素 O (perfringolysin O)、胶原酶 (collagenase)、唾液酸酶 (sialidase)、蛋白酶 (protease) 及血凝素 (hemagglutinin) 等的表达<sup>[17]</sup>。

病原菌在感染宿主的不同阶段, 可根据周围环境的变化适时适量调控其不同毒力因子的表达以完成其致病过程, 其中往往需要几对 TCSTS 的协同作用。猪链球菌在感染宿主的过程中, 可能也有几对 TCSTS 起到调控毒力因子表达的作用, 对这些 TCSTS 进行系统研究, 了解其参与调控的基因, 对于阐明其致病的具体机制及揭示潜在的毒力因子将大有帮助。本实验从其中的一对 TCSTS 入手, 对其编码基因 2148hk/rr 进行敲除, 经初步鉴定, 敲除菌株在生长速度、菌体形态及溶血性等方面与野毒株并无明显差异, 而 TCSTS 作为细菌感受外界环境变化并做出适当应答的调控系统, 其作用往往只有在细菌处于应激状况下, 如在病原菌感染宿主的过程中, 才能表现出来。我们拟在今后的动物感染实验中比较敲除株与野毒株在致病方面的差异, 并通过基因芯片等技术了解二者在基因转录水平上的差别, 从而阐明该调控系统在致病过程中的作用, 为深入了解猪链球菌的致病机制奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] Tang J, Wang C, Feng Y, *et al.* Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med*, 2006, **3**(5): e151.
- [2] Chen C, Tang J, Dong W, *et al.* A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS ONE*, 2007, **2**(3): e315.
- [3] Dziejman M, Mekalanos JJ. Two-component signal transduction and its role in expression of bacterial virulence factors. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1995, pp.305–317.
- [4] William BT, Michael L, Kaori O, *et al.* The virR/virS locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*, 1996, **178**(9): 2514–2520.
- [5] Shimizu T, Ba-Thein W, Tamaki M, *et al.* The virR gene, a member of a class of two-component response regulators, regulates the production of perfringolysin O, collagenase, and hemagglutinin in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*, 1994, **176**(6): 1616–1623.
- [6] Smith HE, Wisselink HJ, Vecht U, *et al.* High-efficiency transformation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2. *Microbiology*, 1995, **141**(1): 181–188.
- [7] Smith HE, Damman M, van der Velde J, *et al.* Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun*, 1999, **67**(4): 1750–1756.
- [8] Charland N, Harel J, Kobisch M, *et al.* *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology*, 1998, **144**(2): 325–332.
- [9] Vecht U, Wisseink HJ, Marian L. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun*, 1991, **59**(9): 3156–3162.
- [10] Smith HE, Vecht U, Wisselink HJ, *et al.* Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infect Immun*, 1996, **64**(10): 4409–4412.
- [11] Cotter PA, Dirita VJ. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol*, 2000, **54**: 519–565.
- [12] West AH, Stock AM. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci*, 2001, **26**(6): 369–376.
- [13] Beier D, Gross R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol*, 2006, **9**(2): 143–152.
- [14] de Greeff A, Buys H, van Alphen L, *et al.* Response regulator important in pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microb Pathog*, 2002, **33**(4): 185–192.
- [15] Ng W, Tsui HT, 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 Bacteriol*, 2005, **187**(21): 7444–59.
- [16] Andrew H, Victor JD, Nell LB, *et al.* A two-component regulatory system, CsrR-CsrS, represses expression of three *Streptococcus pyogenes* virulence factors, hyaluronic acid capsule, streptolysin S, and pyrogenic exotoxin B. *Infect Immun*, 1999, **67**(10): 5298–5305.
- [17] Shimizu T, Shima T, Yoshino K, *et al.* Proteome and transcriptome analysis of the virulence genes regulated by the VirR/VirS system in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*, 2002, **184**(10): 2587–2594.