

猪链球菌 2 型唾液酸合成酶 *neuB* 基因敲除突变株的构建及其生物学特性

董瑞萍^{1,2} 王长军² 程 功² 李 明² 王 晶² 潘秀珍² 唐家琪^{1,2*}

(1. 南京医科大学基础医学院 江苏 南京 210029)

(2. 南京军区军事医学研究所 江苏 南京 210002)

摘 要: 利用同源重组基因敲除方法构建猪链球菌 2 型强毒株 05ZYH33 唾液酸合成酶 *neuB* 基因敲除突变株。PCR 和 Southern 杂交结果均显示 *neuB* 基因在 1 株转化重组体中完全被壮观霉素抗性基因替代, 表明 *neuB* 基因敲除突变体构建成功。生物学特性鉴定显示, 突变体与强毒株在菌落形态、溶血活性以及染色特性方面均无明显差异; 电镜检查发现突变体表面结构组分与强毒株有显著差异, 荚膜明显变薄, 质地更加紧密; 小鼠致病性试验结果显示, 突变体毒力显著减弱。研究结果提示菌体荚膜中的唾液酸对于猪链球菌 2 型侵袭和致病具有重要作用。

关键词: 猪链球菌 2 型, 唾液酸合成酶, 基因敲除, 生物学特性, 致病性

Construction and Function Study of the *neuB* Gene Encoding Sialic Acid Synthase Knock-out Mutant of *Streptococcus suis* Serotype 2

DONG Rui-Ping^{1,2} WANG Chang-Jun² CHENG Gong² LI Ming²
WANG Jing² PAN Xiu-Zhen² TANG Jia-Qi^{1,2*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

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

Abstract: Based on the principle of homologous recombination, we construct gene knock-out mutant of *neuB* gene encoding sialic acid synthase in *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) virulent strain 05ZYH33. PCR analysis and Southern hybridization confirmed that the coding gene of *neuB* was replaced completely by *spc*^r cassette in one mutant, the mutant of 05ZYH33 *neuB* gene was successfully constructed. Analysis of biological characteristics showed that there were no differences in mycelial morphology, hemolytic activity and dyeing properties between the mutant and 05ZYH33; but the capsule of mutant was thinner and more compacted than that of the wild type strain 05ZYH33. Virulence assays with murine model confirmed that the mutant is avirulent. These observations indicate that sialic acid plays an important role in the pathogenesis and invasiveness of SS2.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30730081, 30671848, 30600533); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2006014, BK2007013, BK2008066)

* 通讯作者: Tel: 86-25-84526002; E-mail: tjq85@hotmail.com

收稿日期: 2008-07-10; 接受日期: 2008-09-16

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2, Sialic acid synthase, Gene knock-out, Biological characteristics, Virulence assays

猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2) 是一种重要的人兽共患病病原。目前, 世界范围内发生的人感染该菌的病例已超过 400 例, 其中死亡人数超过 70 人^[1]。我国是本病的重灾区, 1998 年和 2005 年, 我国江苏省和四川省分别发生 SS2 暴发流行感染猪和人的公共卫生事件, 患者中出现了中毒性休克综合征(streptococcal toxic shock syndrome, STSS)^[2]。SS2 的不同分离株致病性具有很大差异, 可能与其毒力因子密切相关。已知与 SS2 致病性相关的毒力因子主要有荚膜多糖(Capsular polysaccharide, CPS)、溶菌酶释放蛋白(Muramidase-released protein, MRP)、胞外因子(Extracellular factor, EF)、溶血素(Suilysin, Sly)等^[3-4]。其中, CPS 是 SS2 极为重要的毒力因子, 无荚膜突变株在体外极易被猪肺巨噬细胞吞噬, 经鼻粘膜接种仔猪无致病性^[5]。SS2 的 CPS 由 5 种单糖组成, 分别为葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰神经氨酸, 摩尔比为

0.95: 3.68: 1.00: 0.80: 1.31^[6]。其中, N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)又称唾液酸, 是一种已在多种致病菌中被证实的毒力因子, 该组分在 SS2 中的致病作用尚不明确。本课题组对 2005 年四川流行的强致病株 05ZYH33 进行了全基因组测序和组功能注释^[7]。生物信息学分析结果显示, 05ZYH33 中含有唾液酸合成酶编码基因 *neuB*。同源比对发现, 该编码基因与 B 群链球菌中的唾液酸合成酶编码基因一致性为 74%。本研究以强致病株 05ZYH33 为对象, 利用同源重组方法获得了 *neuB* 基因敲除突变体, 并通过表型鉴定和体内外试验探讨唾液酸在 SS2 致病过程中的作用。

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。

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 Bacterial strains, plasmids and primers		表型及相关特征 Phenotypes and correlative characters	来源 Sources
菌株 Bacterial strains	05ZYH33	血清型 2 型, 强致病株, <i>neuB</i> ⁺	本室保存
	$\Delta neuB$	血清型 2 型, <i>Spc</i> ^r , <i>neuB</i> ⁻	本研究构建
	mutant1	血清型 2 型, <i>Spc</i> ^r , <i>Amp</i> ^r , <i>neuB</i> ⁺	本研究构建
	<i>E. coli</i> DH5 α	<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 Plasmids	pMD18-T	T 载体, <i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^r	TaKaRa
	pUC18	<i>E. coli</i> 克隆载体, <i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^r	本室保存
	pSET2	<i>E. coli</i> - <i>S. suis</i> 穿梭质粒, <i>Spc</i> ^r	Takamatsu <i>et al.</i> (200)
	LSR-pUC18	<i>neuB</i> 基因敲除质粒, <i>Amp</i> ^r , <i>Spc</i> ^r	本研究构建
引物 Primers	L1	GAATTCGTTAGGTGGATCTGAGTA (下划线为引入的 <i>EcoR</i> I 酶切位点)	
	L2	GGATCCTTTTATTTCCTTTCTAAAA (下划线为引入的 <i>Bam</i> H I 酶切位点)	
	R1	CTGCAGTAAGCGGAGTAAGGATGA (下划线为引入的 <i>Pst</i> I 酶切位点)	
	R2	AAGCTTGCATCTAATAAGGCCTGC (下划线为引入的 <i>Hind</i> III 酶切位点)	
	<i>Spc</i> 1	GGATCCGTTTCGTGAATACATGTTATA (下划线为引入的 <i>Bam</i> H I 酶切位点)	
	<i>Spc</i> 2	CTGCAGGTTTTCTAAAACTGAT (下划线为引入的 <i>Pst</i> I 酶切位点)	
	IN1	ATTACTGTCTTGAAGGGAGTTG	
	IN2	TACCAAGGCTGCTAAGATATCAGG	
	OUT1	GCTACACACTTGCCTCTATCTTAC	
	OUT2	CATCTGAAAAGGTACCCGCTCCTA	

1.2 主要试剂及仪器

Ex Taq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒 DNA 抽提试剂盒均为 TaKaRa 公司产品; 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; SS2 型特异性抗血清为 STATENS SERUM INSTITUT 产品。Gene Pulser Xcell™ 型电穿孔仪为 BIO-RAD 公司产品; Ultro-spec2000 型紫外分光光度计为 Pharmacia 公司产品。JEM-1010 型透射电子显微镜为 JEOL 公司产品。

1.3 实验动物

BALB/c 小鼠 (SPF 级); 雌性; 4 周龄, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。

1.4 05ZYH33 *neuB* 基因敲除突变株的构建和鉴定

1.4.1 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 *neuB* 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^r* cassette)。在限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶的作用下, 将他们依次克隆到 pUC18 载体的 *EcoR*、*BamH*、*Pst* 和 *Hind* 4 个多克隆位点上, 形成 1 个 *spc^r* 基因两侧具有与 *neuB* 上下游同源序列的基因敲除质粒 LSR-pUC18, 如图 1 所示。

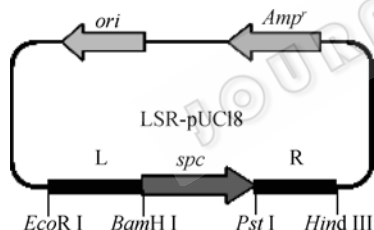


图 1 *neuB* 基因敲除质粒构建示意图

Fig. 1 Construction of gene knock-out plasmid LSR-pUC18

1.4.2 基因敲除突变体的筛选和鉴定: 参照 Smith^[8] 等方法制备 05ZYH33 感受态细菌。在 22.5 kV/cm、200 Ω 和 25 μ F 电转参数下, 用构建好的基因敲除质粒 LSR-pUC18 电转化感受态细菌, 电转结束后将细菌涂布于 THB 平板 (含 100 μ g/mL 壮观霉素), 37°C 培养 48 h, 挑取所有的单菌落进行增菌培养并取菌液 2 μ L 做模板, 用引物 IN1/IN2 (位于 *neuB* 内部) 进行初步筛选, 对疑似阳性菌采用交叉 PCR 和 Southern 杂交验证。

1.5 生物学特性分析

1.5.1 划线培养: 采用分区划线法, 将过夜培养的细菌接种于 THB 血平板 (含 5% 绵羊血) 上, 37°C 培养箱孵育 24 h。

1.5.2 Gram 染色: 常规 Gram 染色法。

1.5.3 凝集试验: 在玻片上滴加生理盐水 10 μ L, 自 THB 血平板刮取细菌均匀涂布于玻片上, 滴加 2 型特异性抗血清 5 μ L, 置于显微镜下观察。设立阴性对照。

1.5.4 免疫电镜: 电镜样本的制作参照 Jacques^[9] 的方法略作改动。自血平板挑取单菌落, 接种于 THB 培养基中, 37°C 静置培养 12 h, 2000 r/min 离心 15 min 收集菌体。磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 mol/L, pH 7.2) 洗 1 次, 调整细菌浓度至 $OD_{540}=1.8$ 。加入猪恢复期血清, 4°C 作用 1 h。PBS 洗 1 次, 20°C、5% 戊二醛固定 2 h。PBS 洗 5 次后用 2% 锇酸后固定 2 h。其后用丙酮逐级脱水, 醋酸铀后固定后包埋切片。样本置于 80 kV 加速电压下观察。

1.6 小鼠致病性试验

SPF 级 BALB/c 小鼠 30 只, 随机分为 3 组, 每组 10 只, 分别经腹腔接种 05ZYH33 菌液、突变体菌液及对照 THB 各 1 mL, 各组攻毒剂量均为 5×10^8 CFU/只。细菌培养参照 Beaudoin^[10] 等方法。

2 结果

2.1 05ZYH33 *neuB* 基因敲除突变株的构建和鉴定

2.1.1 *neuB* 基因敲除质粒的构建: 构建完成基因敲除质粒 LSR-pUC18, 并对重组质粒进行 PCR 及双酶切验证, 结果见图 2、3, 其中由于 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的两个片段大小接近, 因此未能完全分离, 只显示一条条带。对重组质粒进行测序, 结果均显

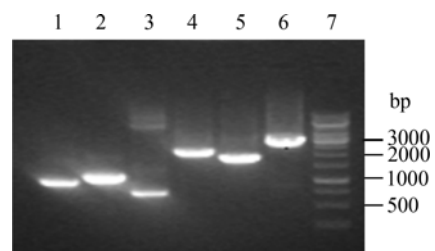


图 2 PCR 扩增产物凝胶电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR product

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.

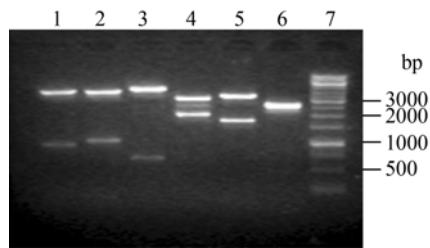


图 3 基因敲除质粒 LSR-pUC18 的双酶切鉴定

Fig. 3 Restriction analysis of plasmid LSR-pUC18

1: LSR-pUC18 digested by *EcoR* I and *Bam*H I; 2: LSR-pUC18 digested by *Bam*H I and *Pst* I; 3: LSR-pUC18 digested by *Pst* I and *Hind* III; 4: LSR-pUC18 digested by *EcoR* I and *Pst* I; 5: LSR-pUC18 digested by *Bam*H I and *Hind* III; 6: LSR-pUC18 digested by *EcoR* I and *Hind* III; 7: 1 kb DNA ladder marker.

示 3 个片段连接次序正确, 重组质粒构建成功。

2.1.2 *neuB* 编码基因敲除突变株的筛选: 取基因敲除质粒 LSR-pUC18 5 μ L 电转化 05ZYH33 感受态细胞, 转化平板经 37°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 筛选 (产物大小 500 bp)。通过上述筛选方法, 在一组菌液 PCR 中, 发现一株扩增结果为阴性(图 4 泳道 7), 将其对应的菌株命名为 $\Delta neuB$, 进行进一步验证。另外取第 1 泳道的 mutant 1 作为单向插入对照。

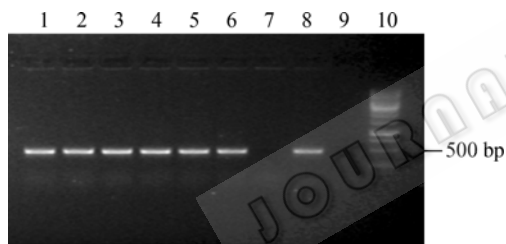


图 4 *neuB* 基因敲除突变体的部分 PCR 初步筛选结果

Fig. 4 Preliminary PCR screening of gene knock-out mutant of *neuB*

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

2.1.3 *neuB* 基因敲除突变体 $\Delta neuB$ 的 PCR 鉴定: 分别于 *neuB* 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 5 所示。如果发生等位基因置换, 分别用引物 OUT1/Spc2、pc1/OUT2、pc1/Spc2 进行 PCR 均可得到阳性结果, 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 能扩增出的 500 bp 的目的片段, 在突变株中将不复存在。结果各 PCR 产物的大小与推测值

相符(图 6)。

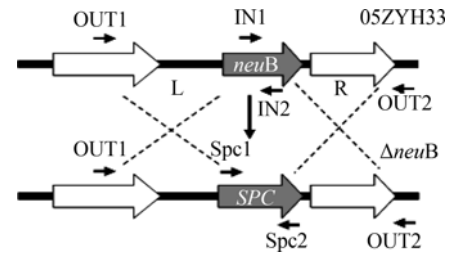


图 5 引物设计示意图

Fig. 5 Primer design

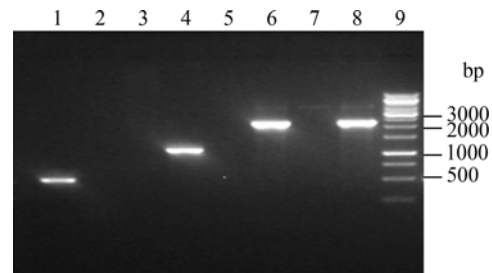


图 6 *neuB* 基因敲除突变体 $\Delta neuB$ 的 PCR 验证

Fig. 6 PCR identification of *neuB* gene knock-out mutant $\Delta neuB$

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

2.1.4 *neuB* 基因敲除突变体 $\Delta neuB$ 的 Southern 杂交验证: 为进一步验证 $\Delta neuB$ 突变株的正确性, 本实验再通过 Southern 杂交对 $\Delta neuB$ 基因组上的突变基因进行定位分析。实验验证探针为 *neuB* 中间片段 (引物 SIN1/SIN2 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 *Hind* 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 2 h 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 7 所示, 在 05ZYH33 和 mutant 1 基因组酶切产物中, 分别出现了一条大于 10 kb 和大于 6 kb 的 *neuB* 探针杂交带, 与预计酶切片段 10.9 kb 和 6.6 kb 大小相符, 而在 $\Delta neuB$ 酶切产物中则未出现杂交条带, 表明 *neuB* 已被敲除。

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

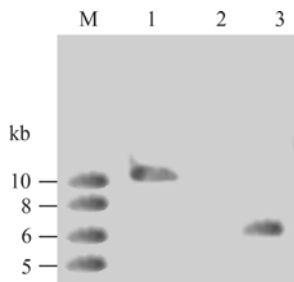


图 7 突变株 $\Delta neuB$ 的 Southern 杂交分析

Fig. 7 Southern hybridization analysis of mutant $\Delta neuB$

1: 05ZYH33 genome/ *Hind* ; 2: $\Delta neuB$ genome/ *Hind* ;
3: Mutant 1 genome/ *Hind* .

2.2 生物学特性分析

2.2.1 划线培养: 采用分区划线法, 将过夜培养的强毒株 05ZYH33 与突变株 $\Delta neuB$ 接种于 THB 血平板(含 5%绵羊血)上, 37°C 培养箱孵育 24 h。二者于平板上均呈灰白色、圆形半透明、湿润、表面光滑的细小菌落, 但直径略有差异, 05ZYH33 菌落的平均直径为 1.5 mm, 而 $\Delta neuB$ 菌落的平均直径为 1 mm。二者溶血活性无差异, 菌落周围均出现明显的 β -溶血环, 宽度为 1 mm~2 mm。

2.2.2 Gram 染色: 显微镜下观察, 强毒株 05ZYH33 与突变株 $\Delta neuB$ 均为典型的革兰氏阳性菌, 菌体形态为圆形或卵圆形, 呈链状排列, 染色特性和菌体形态均无明显差异。

2.2.3 凝集试验: 显微镜下观察, 强毒株 05ZYH33 30 s 内迅速凝集, 而突变株 $\Delta neuB$ 初始无凝集现象发生, 20 min 后开始缓慢凝集。二者阴性对照均无凝集现象发生。

2.2.4 免疫电镜: 为研究唾液酸缺失突变株荚膜的变化, 将强毒株 05ZYH33 与突变株 $\Delta neuB$ 制成超薄切片, 置于透射电镜 80 kV 加速电压下观察。电镜图片显示, SS2 菌体呈圆形或卵圆形, 以双或短链形式存在。突变株 $\Delta neuB$ 较强毒株 05ZYH33 荚膜明显变薄。强毒株 05ZYH33 的荚膜厚度为 110 nm~130 nm, 而突变株的荚膜厚度仅为 50 nm~70 nm。

2.3 小鼠致病实验

为评估唾液酸在 SS2 致病过程中的作用, 采用小鼠模型进行致病实验。将 30 只 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组, 每组 10 只。其中强毒组腹腔注射 05ZYH33 菌液 1 mL/只(约为 5×10^8 CFU 细菌); 突变体组腹腔注射相同剂量的 $\Delta neuB$ 菌液; 阴性对照组注射相同剂量的 THB。强毒组 48 h 内死亡 8 只, 2 只存活小鼠精神萎靡, 数日后逐渐恢复活力; 突变体组接种后 4 只小鼠轻微发病, 24 h 后恢复活力, 全部存活。THB 阴性对照组动物均无明显发病或异常表现。

3 讨论

唾液酸位于众多哺乳动物细胞表面多糖分子的末端, 在细胞间的粘附和信号传导等过程中发挥重要作用^[11]。某些病原菌也进化产生了有效利用唾液酸的机制。在一些可诱发脑膜炎的致病菌, 如 B 群链球菌(Group B *Streptococcus*)和大肠杆菌 K1 (*Escherichia coli* K1)中, 唾液酸被认为是一种重要的毒力因子, 对于细菌突破血脑屏障是非常重要的^[12]。此外, Marques 等^[13]发现 B 群链球菌 型可利用唾液

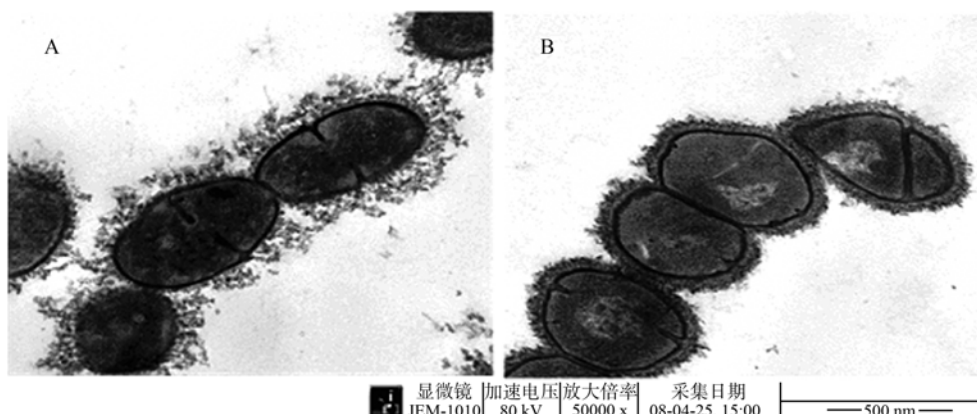


图 8 透射电镜图片

Fig. 8 Transmission electron micrographs of thin sections of *S. suis* 2

Note: A: 05ZYH33; B: $\Delta neuB$.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

酸化的荚膜抑制补体旁途径活化, 从而在缺乏特异性抗体的情况下抵抗补体依赖的细胞毒作用。B 群链球菌还可通过唾液酸成分模拟哺乳动物细胞, 与表达于白细胞表面的唾液酸识别免疫球蛋白超家族凝集素(Siglecs)结合, 传递抑制信号, 以逃避机体天然免疫应答^[14]。大肠杆菌 K1 同样依赖唾液酸化的荚膜抵抗补体介导的杀菌作用^[15]。

唾液酸化的荚膜在 SS2 的侵袭和致病过程中也起到了重要作用, 尽管 SS2 强毒、弱毒及无毒株都具有相似水平的唾液酸化的荚膜, 但无荚膜突变株则完全无毒^[5], 提示荚膜是 SS2 一种毒力所必需的组分。1988 年, Arends^[16]等提出 SS2 荚膜中的唾液酸组分可能是该细菌的毒力因子。Charland 等^[17]通过凝集素封闭和唾液酸酶水解的方法研究唾液酸在 SS2 致病过程中的作用。结果显示, 使用唾液酸酶水解或经凝集素封闭处理后的细菌抗猪单核细胞吞噬能力无明显改变, 但细菌的胞内存活能力略有下降, 处理后的细菌对小鼠的毒力未发生改变。与 B 群链球菌强弱菌株唾液酸含量存在差异不同的是, 猪链球菌不同毒力菌株在唾液酸含量上并无明显差异。基于上述试验结果, Charland 等推测唾液酸可能并非 SS2 关键的毒力因子。但由于上述试验处理唾液酸的方法只是暂时消除其唾液酸表型, 而细菌在试验过程中仍可能处于不断分裂的状态, 增殖产生的细菌必然为唾液酸化的多糖荚膜所覆盖, 在这种情况下评估唾液酸在 SS2 致病过程中的作用略显牵强, 有必要重新审视。

本室对强致病株 05ZYH33 全基因组注释的结果显示, 该菌含有 4 个与唾液酸组分合成相关的基因, 分别编码单磷酸胞苷-N-乙酰神经氨酸合成酶(CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase, NeuA)、唾液酸合成酶(Sialic acid synthase, NeuB)、尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺-2-异构酶(UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase, NeuC)和乙酰转移酶(Acetyltransferase, NeuD)。一般而言, 原核生物中唾液酸的合成首先由底物尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺起始, 在 NeuC 的作用下生成 N-乙酰甘露糖胺, 然后在 NeuB 的催化下生成唾液酸, 其后唾液酸可分为两部分, 一部分直接在 NeuA 的作用下生成单磷酸胞苷-N-乙酰神经氨酸, 而另一部分在 NeuD 的作用下发生 O-乙酰化, 并最终在 NeuA 的作用下生成 O-乙酰化的单磷酸胞

苷-N-乙酰神经氨酸, 这两种产物均可进一步聚合并参与荚膜的组装^[18]。鉴于唾液酸合成酶是其中的关键限速酶, 我们首先选定其编码基因 *neuB* 为靶标, 通过同源重组基因敲除方法构建唾液酸合成酶编码基因缺失突变株, 从基因水平出发对唾液酸在 SS2 致病过程中所发挥的作用进行研究。生物学特性分析结果显示, 突变体较强毒株的菌体形态、生长状态、溶血活性以及染色特性均无明显差异; 但其凝集特性发生显著变化, 凝集时间明显延长, 这可能是由于唾液酸组分缺失导致细菌表面抗原决定簇构象发生改变, 使得抗体与抗原结合受阻而导致时间延长。突变株表面荚膜与强毒株存在显著差异, 荚膜明显变薄, 这可能是由于敲除株荚膜中的唾液酸缺失后, 由该糖产生的静电斥力及亲水性减弱或丧失, 从而导致荚膜皱缩。进一步的小鼠致病性试验结果显示, $\Delta neuB$ 毒力显著减弱。上述结果提示菌体荚膜中的唾液酸对于 SS2 侵袭和致病具有重要作用。当然, 目前尚不清楚唾液酸合成酶的缺失与细菌唾液酸合成缺陷的关联程度, 还需进一步通过唾液酸含量检测等生化试验加以验证。此外, 唾液酸的合成路线还涉及到其他几种催化酶, 它们在其中所扮演的重要作用也有待进一步研究揭示。

参 考 文 献





- [1] Lun ZR, Wang QP, Chen XG, *et al.* *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis*, 2007, 7: 201–209.
- [2] Tang JQ, Wang CJ, Feng YJ, *et al.* Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med*, 2006, 3(5): e151.
- [3] Segura M, Gottschalk M, Olivier M. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun*, 2004, 72: 5322–5330.
- [4] Staats JJ, Plattner BL, Stewart GC, *et al.* Presence of the *Streptococcus suis* suilysin gene and expression of MRP and EF correlates with high virulence in *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Vet Microbiol*, 1999, 70 (3-4): 201–211.
- [5] 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.
- [6] Katsumi M, Saito T, Kataoka Y, *et al.* Comparative preparation methods of sialylated capsule antigen from

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

- Streptococcus suis* type 2 with type specific antigenicity. *J Vet Med Sci*, 1996, **58** (10): 947–952.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Jacques M, Gottschalk M, Foiry B, *et al.* Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**(6): 2833–2838.
- [10] Beaudoin M, Higgins R, Harel J, *et al.* Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, **99**: 111–116.
- [11] Severi E, Hood DW, Thomas GH. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology*, 2007, **153**: 2817–2822.
- [12] Feigin RD, Edwards U. Bacterial meningitis: newer concepts of pathophysiology and neurologic sequelae. *Pediatr Clin North Am*, 1976, **23**: 541–556.
- [13] Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, *et al.* Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect Immun*, 1992, **60**: 3986–3993.
- [14] Carlin AF, Lewis AL, Varki A, *et al.* Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *J Bacteriol*, 2007, **189**: 1231–1237.
- [15] Pluschke G, Mayden J, Achtman M, *et al.* Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing. *Infect Immun*, 1983, **42**(3): 907–913.
- [16] Arends JP, Zanen H. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis*, 1988, **10**: 131–137.
- [17] Charland N, Kobisch M, Gottschalk M, *et al.* Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1996, **14**: 195–203.
- [18] Lewis AL, Nizet V, Varki A. Discovery and characterization of sialic acid O-acetylation in group B *Streptococcus*. *PNAS*, 2004, **101**(30): 11123–11128.

征订启事

2009 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动！

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量