

研究报告

2 型猪链球菌 *SSU0448* 基因敲除突变株的构建及其毒力分析

龚秀芳^{1,2} 胡丹² 朱旭辉² 李娟² 赵琳² 钟璟皓² 潘秀珍² 王长军^{2*}

(1. 南京师范大学 生命科学学院 江苏 南京 210046)

(2. 南京军区军事医学研究所 江苏 南京 210002)

摘要:【目的】通过构建 2 型猪链球菌(SS2)强毒株 05ZYH33 的 *SSU0448* 基因缺失突变株 $\Delta 0448$ 和互补株 C $\Delta 0448$, 探索 *SSU0448* 基因缺失对细菌基本生物学特性和细菌毒力的影响。【方法】用同源重组基因敲除方法构建筛选强毒株 05ZYH33 中 N-乙酰半乳糖胺和半乳糖胺代谢途径相关转录调节因子 *SSU0448* 基因的缺失突变株, 比较分析突变株 $\Delta 0448$ 与野生株 05ZYH33、互补株 C $\Delta 0448$ 的基本生物学特性, 小鼠毒力实验分析 *SSU0448* 基因缺失对细菌毒力的影响。【结果】PCR 检测分析显示, *SSU0448* 基因在转化重组体中被壮观霉素抗性基因所替代, 表明基因敲除突变株构建成功; 同时构建了基因功能互补株 C $\Delta 0448$ 。生物学特性实验表明突变株 $\Delta 0448$ 在成链能力上较野生株明显减弱, 对数生长期稍短, 快速到达平台期; 而菌落形态、革兰氏染色和溶血活性方面无明显差异; 小鼠毒力实验发现, 突变株毒力并无显著改变。【结论】*SSU0448* 基因的敲除能够改变 2 型猪链球菌的成链能力; 不影响其侵袭致病能力, 可能延缓 2 型猪链球菌的发病过程, 此研究为 2 型猪链球菌致病感染奠定了基础。

关键词: 2 型猪链球菌, 基因敲除, 毒力, *SSU0448*

Construction and virulence analysis of the *SSU0448* gene knockout mutant in *Streptococcus suis* serotype 2

GONG Xiu-Fang^{1,2} HU Dan² ZHU Xu-Hui² LI Juan² ZHAO Lin² ZHONG Jing-Hao²
PAN Xiu-Zhen² WANG Chang-Jun^{2*}

(1. Nanjing Normal University, School of Life Science, Nanjing, Jiangsu 210046, China)

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

Abstract: [Objective] Gene knockout mutant $\Delta 0448$ and the functional complementary strain C $\Delta 0448$ were constructed to investigate the role of *SSU0448* gene on *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) morphology and virulence. [Methods] Based on the principle of homologous recombination, the *SSU0448* gene was knocked out in SS2 virulent strain 05ZYH33. PCR analysis was carried out to identify the mutant, then screened the functional complementary strain C $\Delta 0448$ containing the *SSU0448* gene expressing plasmid. The morphology and virulence of the established strains were

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81471920, 31170124, 81172794); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20140096); 南京军区军事医学科技创新课题(No. ZX39)

*通讯作者: ✉: science2008@hotmail.com

收稿日期: 2014-12-08; 接受日期: 2015-02-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-11

examined. **[Results]** PCR analysis and DNA sequencing identified the knockout mutant $\Delta 0448$ and the *SSU0448* gene was completely replaced by the *spc^r* cassette. The functional complementary strain $\Delta 0448$ was also successfully constructed. Gram staining showed that the mutant $\Delta 0448$ grew much shorter than the wild type 05ZYH33 and faster to reach the plateau phase. Deletion of the *SSU0448* gene did not change the virulence of SS2 in mice infection assays. **[Conclusion]** Knockout of *SSU0448* gene obviously influenced the chain ability of *Streptococcus suis* serotype 2, and its deficiency has no significant effect on the virulence in the mice model while it may delay the pathogenesis.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2, Gene knockout, Virulence, *SSU0448*

2 型猪链球菌(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)是一种重要的人兽共患病原菌。20 世纪 90 年代初, 2 型猪链球菌开始在我国广东、四川等地扩散和流行。1998 年和 2005 年分别在我国的江苏南通和四川资阳暴发了大规模猪链球菌感染人的公共卫生事件, 引起重大的经济损失^[1]。感染 2 型猪链球菌患者表现为中毒性休克综合征(Streptococcal toxic shock syndrome, STSS), 死亡率高达 81.3%–93.6%, 引起国内外的广泛关注。猪链球菌感染人的事件时有发生, 截止 2014 年, 2 型猪链球菌已经传播至 30 多个国家和地区, 在世界范围内引发了至少 1 600 例 2 型猪链球菌感染人的事件^[2-3]。因此, 2 型猪链球菌致病机制的研究对于预防该病的发生有重要的意义。随着研究的深入, 越来越多的毒力因子被发现, 根据其在致病过程中发挥的作用, 大致可以分为 3 个亚类: (1) 细胞表面因子: 如荚膜多糖(Capsular polysaccharide, CPS)、溶菌酶释放蛋白(Muramidase-released protein, MRP)和胞外因子(Extracellular factor, EF)^[4]、溶血素(Suilysin, Sly); (2) 蛋白酶: 如谷氨酸脱氢酶(GDH)、烯醇酶(Enolase)和谷氨酰胺脱氢酶^[5]等; (3) 转录调节因子: 如 *rgg*^[6]、*ccpA*^[7]、*argR*^[2]。其中, 转录调节因子不直接参与细菌的毒力, 但是能够调控毒力相关因子的表达, 影响其生物学功能, 进而改变细菌的毒力。

研究证实, 糖代谢参与猪链球菌毒力的调控。葡萄糖代谢过程中的关键酶 *scrB* 能够催化葡萄糖-6-磷酸水解生成葡萄糖和正磷酸, *scrB* 的缺失使细菌的毒力减弱^[8]; *manN* 基因是甘露糖特异的转移

酶, 该基因的缺失也会导致毒力的降低^[7]。猪链球菌的荚膜作为重要的毒力因子, 其荚膜多糖由 5 种单糖组成。完整的荚膜能够保护细菌抗吞噬抗粘附, 对细菌的生存具有重要意义; 敲除 *cps2B* 基因能够阻碍荚膜多糖的合成, 导致细菌毒力的减弱^[9]。唾液酸合成酶基因 *NeuB* 的缺失能够减弱猪链球菌对巨噬细胞的吞噬能力, 进而改变猪链球菌的毒力。然而氨基糖代谢对猪链球菌致病性的影响机制并不明确。

本课题组在 2007 年已经完成了 2 型猪链球菌强毒株 05ZYH33 的基因组注释。通过基因组测序和蛋白质结构分析推测在 05ZYH33 菌株中 *SSU0448* 基因可能是 *agaR* 基因, 参与 N-乙酰半乳糖胺和半乳糖胺的代谢。本研究利用同源重组的原理, 构建了中间为壮观霉素抗性基因、两侧为 *SSU0448* 基因上下游同源序列的基因敲除载体, 将该重组载体电转化强毒株 05ZYH33 感受态细胞, 通过 PCR 筛选 *SSU0448* 基因缺失的突变株, 并对突变株的基本生物学特性和致病性进行分析, 探讨在 SS2 中 *SSU0448* 基因对细菌生物学特性和致病性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物: 本实验所用菌株、质粒及引物见表 1。SS2 强致病株 05ZYH33 分离自 2005 年四川资阳中毒性休克综合征(Streptococcal toxic shock syndrome, STSS)病人的外周血。引物由上海赛百盛基因技术公司合成。猪链球菌用 THB 液体培养基或固体平板培养, 大肠杆菌用 LB (g/L, 蛋白

表 1 菌株、质粒和引物			
Table 1 Bacterial strains, plasmid and primers used in this study			
菌株、质粒及引物		表型及相关特征	来源
Bacterial strains and primers		Phenotypes and correlative characteristics	Sources
菌株 Bacteria strains	05ZYH33	血清型 2 型, 强毒株	本室保存
	Δ0448	本研究构建	本研究构建
	CΔ0448	血清型 2 型 <i>Spc^r</i> , <i>Crm^r</i>	本研究构建
	<i>E. coli</i> DH5α		全式金
	BL21(DE3)		全式金
质粒 Plasmids	pMD18-T	T 载体, <i>lacZ</i> , <i>Amp^r</i>	TaKaRa
	pUC18	<i>Amp^r</i>	
	pUC18-0448	<i>SSU0448</i> 敲除质粒, <i>Spc^r</i>	本研究构建
	pSET2	<i>E. coli</i> - <i>S. suis</i> 穿梭质粒, <i>Spc^r</i>	本室保存
	pVA838-0448	<i>SSU0448</i> 回复质粒, <i>Cm^r</i> , <i>Em^r</i>	本研究构建
引物 Primers	L1	<u>GAGCTCATCCCTCAACAATCTTGTAAT</u> (<i>Sac</i> I)	
	L2	<u>GGATCCACCCAATAACAATCAAAAGTAG</u> (<i>Bam</i> H I)	
	R1	<u>GTCGACAACCTTATTATACTAAATTAGTT</u> (<i>Sal</i> I)	
	R2	<u>GCAATGCCATGTACAGATTCAAGGAGCC</u> (<i>Sph</i> I)	
	Spc1	<u>CGGGATCCGTTTCTAAAATCTGA</u> (<i>Bam</i> H I)	
	Spc2	<u>CCGTCGACGTTTCGTGAATACAT</u> (<i>Sal</i> I)	
	In1	CCATCACTTCACCGCTAGTACT	
	In2	CCTTTGTATCTCGTTCACGTAA	
	Out1	CGTCGTGGTAAGATTACGCTGG	
	Out2	TACAAGCGGTTCTGCATACTCT	
	0448F	<u>GGATCCGTGGAAAGGAAGGAAATAAGTATG</u> (<i>Bam</i> H I)	
	0448R	<u>GTCGACGCGATGGTTGGCTGTAATTTTC</u> (<i>Sal</i> I)	

豚 10, 酵母提取物 5, NaCl 5) 液体或固体平板培养。

1.1.2 主要试剂、仪器和细胞系: 限制性内切酶 *Sac* I、*Bam* H I、*Sal* I 和 *Sph* I, T4 DNA 连接酶, 250 bp DNA Ladder Marker, Prime Script™ Master Mix (Perfect Real Time), 质粒 DNA 提取和 PCR 扩增试剂盒, 均为 TaKaRa 公司产品; 基因组提取试剂盒, 上海捷瑞生物工程公司产品; Todd-Hewitt Broth (THB), 购自 Difco 公司; DNA 胶回收试剂盒和总 RNA 提取试剂盒, 购自 Promega 公司; Gene Pulser Xcell™ 型电穿孔仪, Bio-Rad 公司产品; CFSE-Live Cell Labeling Kit, 东仁化学科技(上海)有限公司; BD FACS Calibur 型流式细胞仪, 美国 BD 公司产品; Hep-2 细胞(CCTCC GDC004), 本室

保存; RAW264.7 (ATCC TIB-71, Rockville, MD, USA), 本室保存。

1.2 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。

1.3 SSU0448 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 基因组为模板, 用引物对 L1/L2、R1/R2 进行 PCR 扩增 *SSU0448* 的上、下游片段 L 和 R; 以 pSET2 质粒为模板, 用 *Spc1*/*Spc2* 扩增壮观霉素抗性基因(*spc^r* cassette)片段。PCR 扩增体系(25 μL): ddH₂O 18.3 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, dNTP mix 2 μL, 上游引物(10 μmol/L) 0.5 μL, 下游引物(10 μmol/L)

0.5 μ L, Ex *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L, 模板(约 100 mg/L) 1 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 52 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。利用限制性内切酶和 T4 连接酶依次将 L、*spc*^r、R 克隆到 pUC18 质粒的 *Sac* I、*Bam* H I、*Sal* I 和 *Sph* I 四个多克隆位点, 形成在 *spc*^r 基因两侧具有与 *SSU0448* 基因上、下游同源序列的基因敲除质粒 pUC18-0448 (图 1)。载体经 PCR 验证, 双酶切验证之后再送南京金瑞斯生物科技有限公司测序确认。

1.3.2 突变株的筛选与鉴定: 参照 Smith 等^[10]的方法, 略有改动, 制备 05ZYH33 感受态细胞。将构建好的基因敲除质粒 pUC18-0448 电转导入 05ZYH33 感受态细胞中, 电转参数为 22.5 kV/cm、200 Ω 和 25 μ F。电转结束后, 将细菌涂布于 THB 平板(含 100 mg/L 壮观霉素), 37 $^{\circ}$ C 培养 24–48 h。挑取平板上所有的单菌落, 37 $^{\circ}$ C、225 r/min 过夜振荡培养, 取 2 μ L 菌液作模板, 用 In1/In2 进行 PCR 初筛, 对于 In1/In2 扩增为阴性的突变株, 再用 In1/In2、*Spc*1/*Spc*2、*Spc*1/*Out*2、*Out*1/*Spc*2 四对引物进行验证, 验证得到的疑似敲除株送南京金瑞斯生物科技有限公司测序, 经测序确认后的突变株命名为 Δ 0448。

1.3.3 互补株 CA0448 的构建和鉴定: 以 05ZYH33 基因组为模板, 用引物对 0448F/0448R 扩增 *SSU0448* 基因的全长, PCR 产物连接到回复突变质

粒 pVA-838 上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单菌落, 经酶切验证和测序验证正确后, 电转导入 Δ 0448 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 得到功能互补株, 命名为 CA0448。

1.4 细菌总 RNA 的提取和 RT-PCR

取培养过夜的野生株、敲除株和互补株菌液各 1 mL, 提取细菌总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳确认 RNA 的完整性, 并用核酸测定仪测定 RNA 的浓度和质量, 反转录生成 cDNA。以 cDNA 作为模板, 用 In1/In2 进行 PCR 扩增, 检测 *SSU0448* 基因在 3 种菌株中的转录情况。

1.5 细菌生物学特性分析

将新鲜培养的菌液调至相同的浓度, 以同样的比例分别接种到 100 mL 新鲜的无抗性的 THB 液体培养基中。每隔 1 h 测定 *OD*₆₀₀ 的值, 连续测定 14 h, 绘制生长曲线。根据细菌的生长曲线, 取 3 种细菌对数生长中后期的新鲜菌液, 进行常规革兰氏染色。并分别划线接种于哥伦比亚血平板(含 5% 无菌绵羊血), 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 观察三者的菌落形态和溶血活性。

1.6 流式细胞仪检测细菌与细胞的粘附与吞噬

1.6.1 细菌与人喉癌上皮细胞 Hep-2 细胞的粘附: 参照 Hytönen 等^[11]的方法, 略有改进, 用 CFSE 标记的细菌与 Hep-2 人喉癌上皮细胞 37 $^{\circ}$ C 共孵育, 约 20 r/min 轻柔振荡 2 h (细菌与细胞的比例约为 100:1), 加入等体积的含 4% (质量体积比) 多聚甲醛的 PBS 溶液固定, 冰上放置, BD FACS Calibur 型流式细胞仪检测。

1.6.2 细菌与小鼠巨噬细胞 Raw 264.7 的吞噬: 与粘附实验一样, 在细菌与细胞轻柔振荡, 37 $^{\circ}$ C 共孵育 2 h 后, 用终浓度为 100 mg/L 庆大霉素(Gentamycin)和 5 mg/L 青霉素(Penicillin G)的双抗作用 1 h, 加入等体积的含 4% (质量体积比) 多聚甲醛的 PBS 溶液固定, 冰上放置, BD FACS Calibur 型流式细胞仪检测。

1.7 定量 PCR 分析基因表达

为了验证 *SSU0448* 基因是否参与 N-乙酰半乳

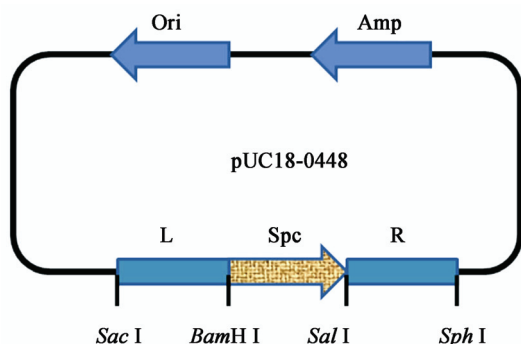


图 1 *SSU0448* 基因敲除质粒构建示意图

Figure 1 Construction of gene knockout plasmid pUC18-0448

糖胺和半乳糖胺的代谢, 取对数生长后期的 3 种菌液各 1 mL, 反转录生成的 cDNA, 以此为模板, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)管家基因作内参, 定量 PCR 检测参与该代谢通路的基因 *agaY* (SSU1259)、*agaS* (SSU0195)、*bgaC* (SSU0449)、*gadVW* (SSU0450)、*gadWE* (SSU0451)、*gadEF* (SSU0452) 的表达情况, 数据分析采用标准 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行^[12]。定量 PCR 程序: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 55 °C 10 s, 72 °C 5 s, 共 40 个循环; 65 °C 15 s, 40 °C 10 s。

1.8 小鼠致病性实验

SPF 级 BALB/c 小鼠 40 只, 每组 10 只, 随机分成 4 组, 取对数中后期的 3 种菌液, 用 THB 培养基调整细菌的浓度到约 1×10^8 CFU/mL。突变株组、野生株组和功能互补株组腹腔注射 1 mL 菌液, 空白对照组接种相同剂量的无菌 THB 液体培养基。

2 结果与分析

2.1 SSU0448 基因敲除突变株的构建和鉴定

2.1.1 敲除质粒的构建: 首先构建了基因敲除质粒

pUC18-0448, 并对其验证。(1) 采用不同引物 (L1/L2、Spc1/Spc2、R1/R2、L1/Spc2、Spc1/R2、L1/R2) 对构建好的质粒 pUC18-0448 进行 PCR 扩增, 得到的片段大小和理论值一致, 结果如图 2A 所示。(2) 对敲除质粒进行双酶切验证, 各组酶切产物大小均与理论预期值吻合, 双酶切产物出现 6 条相应的核酸片段(图 2B)。(3) 对重组质粒进行测序, 显示 L、*spcI* 和 R 片段都连接到敲除质粒, 连接顺序正确, 证实重组质粒构建成功。

2.1.2 突变株的初筛: 从基因敲除质粒 pUC18-0448 电转化 05ZYH33 感受态细胞之后的 THB 平板 (含壮观霉素抗性) 上挑取单菌落于 THB 培养基中 (含壮观霉素抗性) 培养 12–24 h, 取 2 μ L 作模板, 用 In1/In2 进行 PCR 扩增(理论大小为 449 bp), 其中 1 株扩增结果为阴性, 疑似敲除菌株(图 3A)。

2.1.3 突变株 Δ 0448 的 PCR 鉴定: 在 SSU0448 基因上下游片段 L 和 R 的核酸序列外侧设计合成一对引物 Out1/Out2。如果敲除质粒与细菌基因组发生双臂等位基因交换, 突变株用 Spc1/Spc2、Spc1/

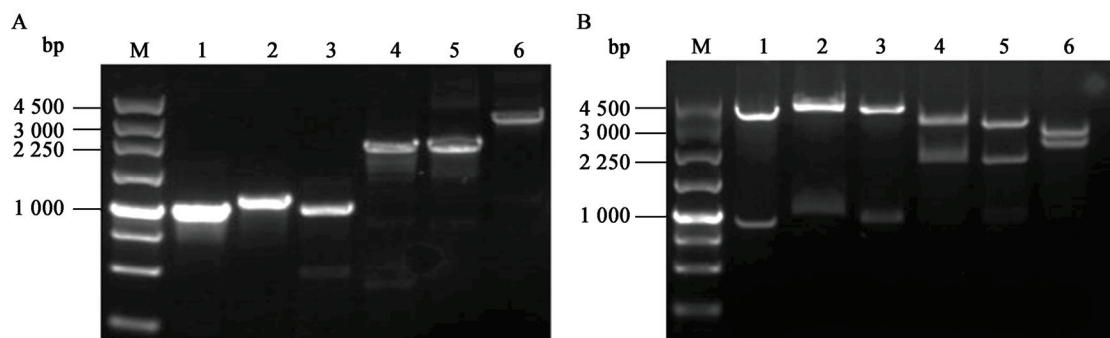


图 2 敲除质粒 pUC18-0448 验证

Figure 2 Identification of gene knock out plasmid pUC18-0448

注: A 中 M: 250 bp DNA ladder marker; 1: 引物 L1/L2 扩增产物(1 026 bp); 2: 引物 Spc1/Spc2 扩增(1 130 bp); 3: 引物 R1/R2 扩增产物(1 024 bp); 4: 引物 L1/Spc2 扩增产(2 056 bp); 5: 引物 Spc1/R2 扩增产物(2 054 bp); 6: 引物 L1/R2 扩增产物(3 068 bp)。B 中 M: 250 bp DNA ladder marker; 1: pUC18-0448 *Sac* I / *Bam* H I 双酶切产物(4 829、1 026 bp); 2: pUC18-0448 *Bam* H I / *Sal* I 双酶切产物(4 718、1 142 bp); 3: pUC18-0448 *Sal* I / *Sph* I 双酶切产物(4 843、1 018 bp); 4: pUC18-0448 *Sac* I / *Sph* I 双酶切产物(2 150、3 710 bp); 5: pUC18-0448 *Bam* H I / *Sph* I 双酶切产物(2 154、3 712 bp); 6: pUC18-0448 *Sac* I / *Sph* I 双酶切产物(3 180、2 686 bp)。

Note: A: M: 250 bp DNA ladder marker; 1: PCR products (1 026 bp) with L1/L2; 2: PCR products (1 130 bp) with Spc1/Spc2; 3: PCR products (1 024 bp) with R1/R2; 4: PCR products (2 056 bp) with L1/Spc2; 5: PCR products (2 054 bp) with Spc1/R2; 6: PCR products (3 068 bp) with L1/R2. B: M: 250 bp DNA ladder marker; 1: pUC18-0448 digested by *Sac* I / *Bam* H I (4 829, 1 026 bp); 2: pUC18-0448 digested by *Bam* H I / *Sal* I (4 718, 1 142 bp); 3: pUC18-0448 digested by *Sal* I / *Sph* I (4 843, 1 018 bp); 4: pUC18-0448 digested by *Sac* I / *Sal* I (2 150, 3 710 bp); 5: pUC18-0448 digested by *Bam* H I / *Sph* I (2 154, 3 712 bp); 6: pUC18-0448 digested by *Sac* I / *Sph* I (3 180, 2 686 bp)。

Out2、Out1/Spc2 进行 PCR 扩增均能扩增出条带，而用引物 In1/In2 (位于 *SSU0448* 内部)扩增突变株则无 449 bp 的目的片段；而在未发生双交换的野生株 05ZYH33 中，除引物 In1/In2 可得到 *SSU0448* 基因内部 449 bp 大小的片段外，其余引物对的 PCR 扩增均为阴性。采用上述组合 PCR 检测方法，对初筛得到的疑似敲除菌株进行 PCR 鉴定，各组扩增产物的大小与预期发生双交换突变株推测一致(图 3B)，Out1/Out2 扩增突变株所得的产物送测序公司测序验证，序列正确，表明 *SSU0448* 基因已被成功敲除。

2.2 功能互补株 CΔ0448 的构建和鉴定

2.2.1 PCR 初筛：为进一步证实突变株 Δ0448 在生物学特性和细菌毒力方面的改变是由 *SSU0448* 基因敲除引起的，而不产生其他影响，使用 0448F/0448R 扩增 *SSU0448* 基因的全长，构建了回复质粒 pVA838-0448。将 pVA838-0448 电转化突变株 Δ0448 感受态细胞，在 THB 抗性平板(含壮观霉

素抗性和红霉素抗性)上挑取单菌落进行培养，PCR 扩增培养物，如果回复质粒成功转入突变株 Δ0448 感受态细胞中，功能互补株用引物对 In1/In2、Spc1/Spc2、0448F/0448R 进行 PCR 扩增均能得到阳性结果，而野生株用 Spc1/Spc2 扩增得到阴性结果，突变株 Δ0448 中则只能检测到 Spc1/Spc2 的扩增条带，表明初筛得到功能互补株 CΔ0448 (图 4A)。

2.2.2 RT-PCR 验证：通过上述 PCR 初筛证实了 *SSU0448* 基因在 DNA 水平的回复。为进一步验证其在转录水平的回复，提取功能互补株 CΔ0448 的总 RNA 反转录后，用 In1/In2 进行 PCR 扩增。PCR 扩增片段长度符合预期(理论大小为 449 bp)，经测序确认，证实 *SSU0448* 基因在转录水平上已经成功回复(图 4B)。

2.3 突变株基本生物学特性分析

2.3.1 生长速率比较：绘制突变株 Δ0448、野生株 05ZYH33 与功能互补株 CΔ0448 的生长曲线(图 5)，突变株 Δ0448 于接种 3 h 左右进入对数生长期，生

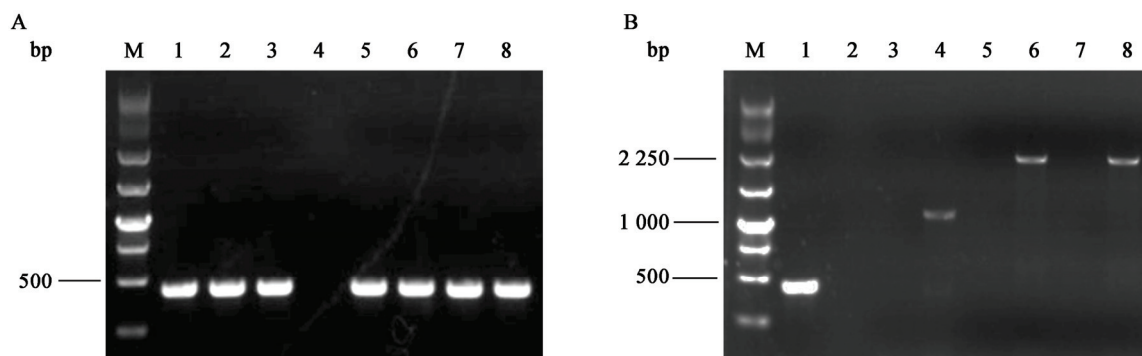


图 3 *SSU0448* 基因敲除株突变株的 PCR 筛选结果

Figure 3 PCR screening of gene knockout mutant Δ0448

注：A：M：250 bp DNA ladder marker；1：突变株 1；2：突变株 2；3：突变株 3；4：突变株 4；5：突变株 5；6：突变株 6；7：突变株 7；8：突变株 8。B：M：250 bp DNA ladder marker；1：引物 In1/In2 扩增 05ZYH33 基因组；2：引物 In1/In2 扩增 Δ0448 基因组；3：引物 Spc1/Spc2 扩增 05ZYH33 基因组；4：引物 Spc1/Spc2 扩增 Δ0448 基因组；5：引物 Spc1/Out2 扩增 05ZYH33 基因组；6：引物 Spc1/Out2 扩增 Δ0448 基因组；7：引物 Out1/Spc2 引扩增 05ZYH33 基因组；8：引物 Out1/Spc2 扩增 Δ0448 基因组。

Note：A：M：250 bp DNA ladder marker；1-8：Mutant 1-8。B：M：250 bp DNA ladder marker；1：PCR products of 05ZYH33 genomic with In1/In2 (449 bp)；2：PCR products of Δ0448 genomic with In1/In2；3：PCR products of 05ZYH33 genomic with Spc1/Spc2 (1 130 bp)；4：PCR products of Δ0448 genomic with Spc1/Spc2 (1 130 bp)；5：PCR products of 05ZYH33 genomic with Spc1/Out2；6：PCR products of Δ0448 genomic with Spc1/Out2 (2 335 bp)；7：PCR products of 05ZYH33 genomic with Out1/Spc2；8：PCR products of Δ0448 genomic with Out1/Spc2 (2 268 bp)。

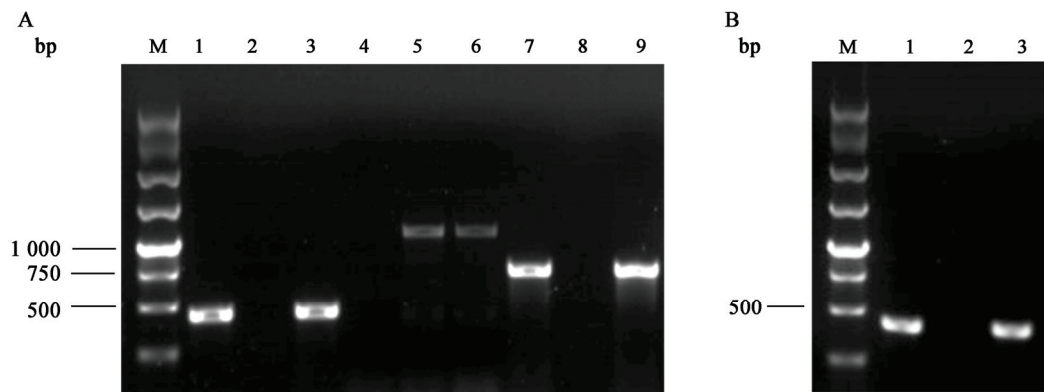


图 4 *SSU0448* 基因功能互补株的 PCR 验证

Figure 4 PCR identification of functional complementation of gene knockout mutant $\Delta 0448$

注: A: M: 250 bp DNA ladder marker; 1: In1/In2 扩增野生株 05ZYH33 的基因组; 2: In1/In2 扩增 $\Delta 0448$ 的基因组; 3: In1/In2 扩增 C $\Delta 0448$ 的基因组; 4: Spc1/Spc2 扩增 05ZYH33 的基因组; 5: Spc1/Spc2 扩增 $\Delta 0448$ 的基因组; 6: Spc1/Spc2 扩增 C $\Delta 0448$ 的基因组; 7: 0448F/0448R 扩增 05ZYH33 的基因组; 8: 0448F/0448R 扩增 $\Delta 0448$ 的基因组; 9: 0448F/0448R 扩增 C $\Delta 0448$ 的基因组. B: M: 250 bp DNA ladder marker; 1: In1/In2 扩增野生株的 cDNA; 2: In1/In2 扩增 $\Delta 0448$ 的 cDNA; 3: In1/In2 扩增 C $\Delta 0448$ 的 cDNA.

Note: A: M: 250 bp DNA ladder marker; 1: PCR products of 05ZYH33 genomic with In1/In2; 2: PCR products of $\Delta 0448$ genomic with In1/In2; 3: PCR products of C $\Delta 0448$ genomic with In1/In2; 4: PCR products of 05ZYH33 genomic with Spc1/Spc2; 5: PCR products of $\Delta 0448$ genomic with Spc1/Spc2; 6: PCR products of C $\Delta 0448$ genomic with Spc1/Spc2; 7: PCR products of 05ZYH33 genomic with 0448F/0448R; 8: PCR products of $\Delta 0448$ genomic with 0448F/0448R; 9: PCR products of C $\Delta 0448$ genomic with 0448F/0448R. B: M: 250 bp DNA ladder marker; 1: PCR products of 05ZYH33 cDNA with In1/In2; 2: PCR products of $\Delta 0448$ cDNA with In1/In2; 3: PCR products of C $\Delta 0448$ cDNA with In1/In2.

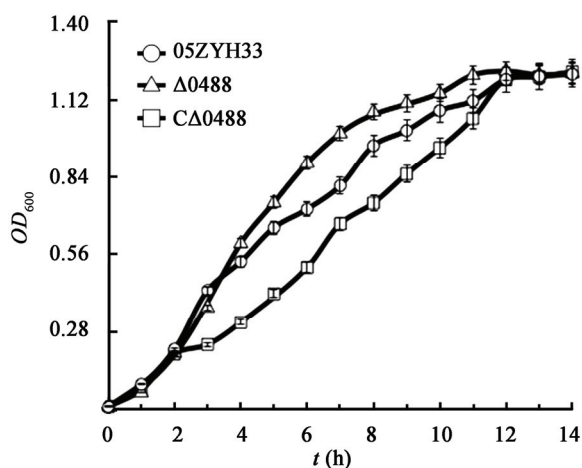


图 5 突变株 05ZYH33、 $\Delta 0448$ 和 C $\Delta 0448$ 的生长曲线比较

Figure 5 Comparison of the growth characteristics of 05ZYH33, $\Delta 0448$ and C $\Delta 0448$

长速率略快于野生株 05ZYH33 和功能互补株 C $\Delta 0448$; 野生株 05ZYH33 和功能互补株 C $\Delta 0448$ 大概在培养 12 h 后进入平台期, 而突变株 $\Delta 0448$

略快于野生株 05ZYH33, 约在培养 11 h 后。

2.3.2 形态比较: 过往研究证实^[5], 2 型猪链球菌能在绵羊血平板上产生不典型 β 溶血。将突变株 $\Delta 0448$ 、野生株 05ZYH33 与功能互补株 C $\Delta 0448$ 接种于含有 5% 绵羊血 THB 平板上, 37 °C 培养 24 h 后均生长出灰白色、圆形、半透明细小菌落, 3 种菌株的菌落平均直径约 2–3 mm, 菌落周围均出现明显的 β 溶血环, 宽度约为 1–2 mm。三者的溶血活性没有明显的差异。

2.3.3 革兰氏染色: 取对数生长期突变株 $\Delta 0448$ 与野生株 05ZYH33、功能互补株 C $\Delta 0448$ 进行革兰氏染色, 显微镜(1 000 \times)下观察发现: 三者革兰氏染色均为阳性, 菌体形态为圆形或椭圆形, 呈链状排列。与野生株 05ZYH33 相比, 突变株 $\Delta 0448$ 的菌体排列明显松散且链长较短, 成链能力明显减弱; 而功能互补株 C $\Delta 0448$ 与野生株 05ZYH33 的链长相当, 说明细菌成链能力在回复突变株中得到回复,

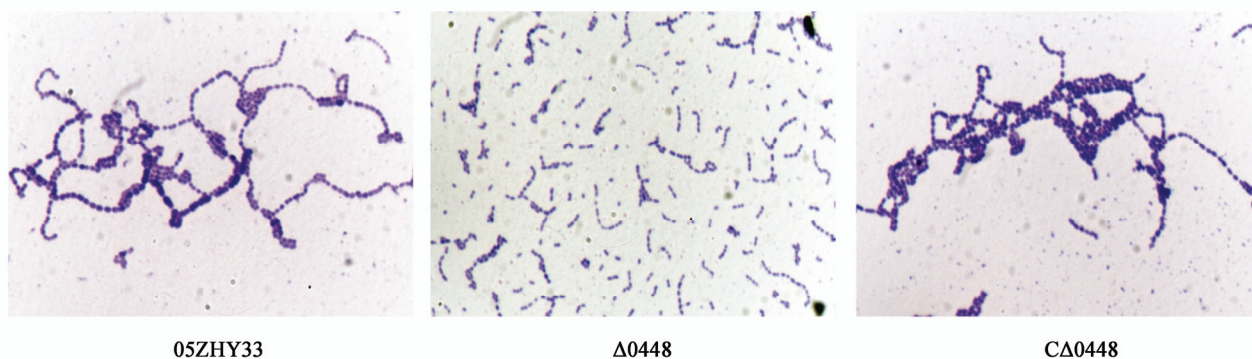


图6 05ZYH33、 Δ 0448 和 C Δ 0448 的革兰氏染色
Figure 6 Gram's stain of 05ZYH33, Δ 0448 and C Δ 0448

表明 *SSU0448* 基因影响 2 型猪链球菌的成链(图 6)。

2.4 细菌与细胞的粘附与吞噬

病原细菌与上皮细胞的粘附是细菌致病感染的第一步,病原菌在宿主体内的增殖需要抵抗巨噬细胞的吞噬,为了探明体外 *SSU0448* 基因是否参与细菌致病过程,比较了野生株 05ZYH33 和突变株 Δ 0448 对人上皮细胞(Hep-2)的粘附能力(图 7),以及对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的抗吞噬能力(图 8),用流式细胞仪检测之后,计算两组细菌与细胞粘附、吞噬的平均荧光强度值,可知突变株的粘附能力和抗吞噬能力没有发生明显的变化。

2.5 N-乙酰半乳糖胺和半乳糖胺代谢通路基因表达的分析

为了验证 *SSU0448* 基因是否参与 N-乙酰半乳糖胺和半乳糖胺代谢通路,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为管家基因,定量 PCR 分析敲除株和野生株中该通路中基因相对表达量的变化(图 9)。相对于野生株,在 Δ 0448 敲除株中,除 *agaS* 基因表达没有明显的变化,*agaY* 基因的表达明显下调,*bgaC*、*gadVW*、*gadWE* 和 *gadEF* 四个基因的表达发生了明显的上调,其中 *gadVW* 基因的表达上调最明显。与我们预测的一致,即 *SSU0448* 基因在该代谢通路中属于转录抑制因子。该基因的缺失,使得代谢通路部分基因的表达发生了上调,而 *agaY* 基因的表达下调,可能的原因是该基因是代谢通路的限速基因,因而 *SSU0448* 的缺失,使得该代谢通路整体的

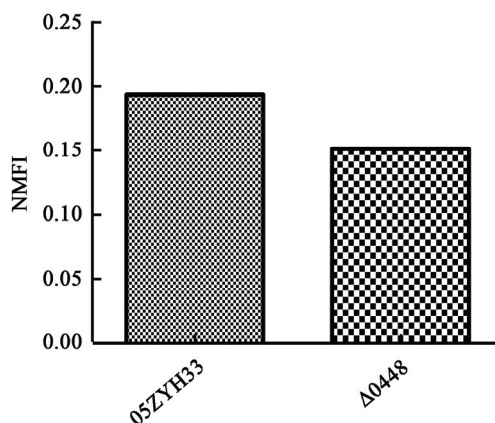


图7 流式细胞术检测野生株05ZYH33和敲除株 Δ 0448的粘附能力

Figure 7 Evaluation of adhesion ability of Δ 0448 mutant by flow cytometry

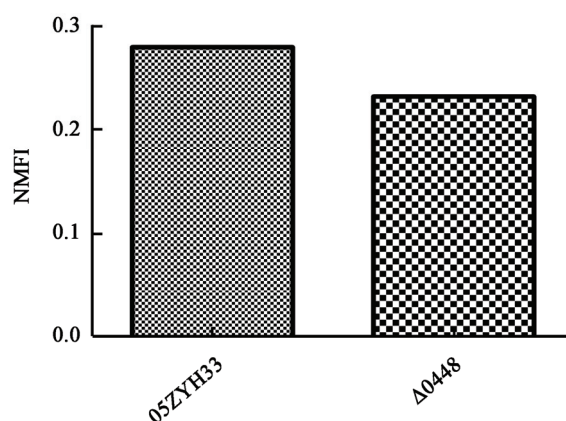


图8 流式细胞术检测野生株05ZYH33和敲除株 Δ 0448的抗吞噬能力

Figure 8 Evaluation of anti-phagocytic ability of Δ 0448 mutant by flow cytometry

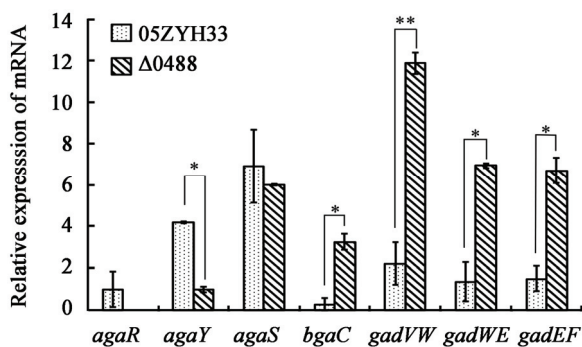


图 9 N-乙酰半乳糖胺和半乳糖胺代谢通路中基因表达的比较

Figure 9 The relative gene expression of the GalN/GalNAc metabolism pathway

代谢水平发生了上调,而具体的调控机制有待进一步实验验证。总之,我们证实了 *SSU0448* 基因参与 N-乙酰半乳糖胺和半乳糖胺代谢通路,并且在该通路中起了重要的调节作用。

2.6 小鼠致病性实验

为探索 *SSU0448* 基因对 2 型猪链球菌致病力的影响,应用小鼠模型进行致病性实验。突变株组、野生株组和功能互补株组小鼠在接种致死剂量 (1×10^8 CFU/mL) 后,6 h 后均出现精神萎靡、食欲下降等反应;野生株组和功能互补株组会出现体温下降的现象,而突变株组接种 $\Delta 0448$ 后,体温正常;12 h 后野生株和功能互补株小鼠均死亡,突变株小鼠死亡 7 只,24 h 突变株小鼠全部死亡,而对照组的小鼠无死亡。因此,我们推测 *SSU0448* 基因缺失不能显著改变 2 型猪链球菌的毒力,可能会延缓 2 型猪链球菌的发病过程。

3 结论与讨论

本课题组在完成 2 型猪链球菌强毒株 05ZYH33 全基因组测序的基础上,通过与国际标准株基因组序列比对,发现 05ZYH33 含有一个 89 K 的毒力岛^[1];该岛含有二元信号调控系、IV 型分泌系统等与致病性相关的基因组分。前期实验证明二元信号调控系统 SalK/SalR,对 05ZYH33 的强致病性是必不可少的^[13],随着研究的深入,越来越多参与致病

的毒力成分被发现,除了毒力岛,在基因组的非毒力岛区域,通过基因敲除技术也发现了一些参与细菌毒力相关的因子。本研究通过同源重组基因技术,敲除 2 型猪链球菌非毒力岛区域的 *SSU0448* 基因,成功获得了突变株 $\Delta 0448$;为证实突变株 $\Delta 0448$ 在生物学特性和细菌毒力方面的改变是由 *SSU0448* 基因敲除引起的,而对细菌没有其他影响。本研究通过电转化 *SSU0448* 基因表达质粒进入突变株 $\Delta 0448$ 中获得功能互补株 C $\Delta 0448$ 。在此基础上,我们系统比较分析了 3 种菌株的基本生物学特性:*SSU0448* 基因敲除对细菌的生长速率,溶血活性没有明显影响。而革兰氏染色发现,敲除株的成链能力明显低于野生株,在回复突变株中细菌的成链能力得到回复,结果表明 *SSU0448* 可能参与猪链球菌成链能力的调控。细菌的成链是一个复杂的过程,与培养条件如培养基的成分,环境压力如酸碱度等密切相关,也与自身基因的表达密切相关。Gonzalo Asensio 等^[14]在结核杆菌中发现 PhoP/PhoR 二元系统敲除后的结核杆菌,其菌落不再呈现索状生长的特点,进一步分析表明,该突变株合成脂质的能力大大低于野生株,而结核杆菌的生物学性状正是与该细菌细胞壁上的脂质成分密切相关的。有报道表明 N-乙酰半乳糖胺是细菌细胞壁的组成成分^[15],结合本研究的结果,我们推测突变株成链能力的改变可能是 *SSU0448* 基因的敲除,使 N-乙酰半乳糖胺和半乳糖胺的代谢通路发生了改变,影响了细菌细胞壁的结构,细菌与细菌之间相互作用发生了改变,从而改变了细菌的成链能力。

为探讨 *SSU0448* 基因的缺失与细菌毒力之间的关系,我们在体外进行了细菌和上皮细胞的粘附以及细菌与小鼠巨噬细胞的抗吞噬能力的实验,结果表明敲除株 $\Delta 0448$ 和野生株 05ZYH33 对细胞的粘附和吞噬没有明显的变化。由于细菌与细胞的粘附与吞噬对细菌的致病力并非决定性的,所以我们又以小鼠为模型,研究了敲除株 $\Delta 0448$ 、野生株 05ZYH33 和互补株 C $\Delta 0448$ 的致病力。小鼠毒力实验表明,尽管突变株小鼠体温下降比野生株慢,但

突变株、野生株和互补株的小鼠最后都死亡,即突变株的致病力较野生株并未发生明显改变。综合以上结果,可能的原因是2型链球菌的致病是一个多阶段多因子共同作用的结果,特定阶段发挥作用的毒力因子能被冗余的或者其他的毒力因子所补偿^[9,16-20]。即SSU0448基因的缺失可能被其他的毒力因子所取代,导致单独敲除该基因并不会改变细菌的毒力。

经过对2型猪链球菌强毒株05ZYH33中SSU0448基因敲除株的基础研究,我们发现该基因的缺失能明显改变2型猪链球菌的成链能力,不影响其侵袭致病能力,可能延缓2型猪链球菌的发病过程。后续我们将从该代谢通路出发,进一步探讨该代谢通路中其他基因与细菌毒力的关系,找出该通路中影响细菌毒力的关键基因,本文结果为研究2型猪链球菌致病感染奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Chen C, Tang J, Dong W, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates[J]. PLoS One, 2007, 2(3): e315
- [2] Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, et al. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen[J]. Clinical Infectious Diseases, 2009, 48(5): 617-625
- [3] Feng Y, Zhang H, Wu Z, et al. *Streptococcus suis* infection: an emerging/reemerging challenge of bacteria infectious diseases? [J]. Virulence, 2014, 5(4): 477-497
- [4] Berthelot-Hérault F, Morvan H, Kéribin AM, et al. Production of muramidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France[J]. Veterinary Research, 2000, 31(5): 473-479
- [5] Si Y, Yuan F, Chang H, et al. Contribution of glutamine synthetase to the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 139(1/2): 80-88
- [6] Zheng F, Ji H, Cao M, et al. Contribution of the *rgg* transcription regulator to metabolism and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(3): 1319-1328
- [7] Willenborg J, Fulde M, de Greeff A, et al. Role of glucose and CcpA in capsule expression and virulence of *Streptococcus suis*[J]. Microbiology, 2011, 157(6): 1823-1833
- [8] Wilson TL, Jeffers J, Rapp-Gabrielson VJ, et al. A novel signature-tagged mutagenesis system for *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 122(1/2): 135-145
- [9] 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[J]. Infection and Immunity, 1999, 67(4): 1750-1756
- [10] Smith HE, Wisselink HJ, Vecht U, et al. High-efficiency transformation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2[J]. Microbiology, 1995, 141(1): 181-188
- [11] Hytönen J, Haataja S, Finne J. Use of flow cytometry for the adhesion analysis of *Streptococcus pyogenes* mutant strains to epithelial cells: investigation of the possible role of surface pullulanase and cysteine protease, and the transcriptional regulator *Rgg*[J]. BMC Microbiology, 2006, 6: 18
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [13] Li M, Wang C, Feng Y, et al. SalK/SalR, a two-component signal transduction system, is essential for full virulence of highly invasive *Streptococcus suis* serotype 2[J]. PLoS One, 2008, 3(5): e2080
- [14] Gonzalo Asensio J, Maia C, Ferrer NL, et al. The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(3): 1313-1316
- [15] Freymond PP, Lazarevic V, Soldo B, et al. Poly(glucosyl-N-acetylgalactosamine 1-phosphate), a wall teichoic acid of *Bacillus subtilis* 168: its biosynthetic pathway and mode of attachment to peptidoglycan[J]. Microbiology, 2006, 152(6): 1709-1718
- [16] Feng Y, Cao M, Shi J, et al. Attenuation of *Streptococcus suis* virulence by the alteration of bacterial surface architecture[J]. Science Report, 2012, 2: 710
- [17] Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, et al. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2[J]. Infection and Immunity, 1991, 59(9): 3156-3162
- [18] 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[J]. Veterinary Microbiology, 1999, 70(3/4): 201-211
- [19] Gottschalk MG, Lacouture S, Dubreuil JD. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin[J]. Microbiology, 1995, 141(1): 189-195
- [20] Wang C, Li M, Feng Y, et al. The involvement of sortase A in high virulence of STSS-causing *Streptococcus suis* 2[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2009, 91(1): 23-33