

猪链球菌 2 型菌毛骨架蛋白编码基因 *SSU2101* 敲除突变株的构建及其生物学功能

秦跃红^{1,2} 王长军^{1,2} 陈红娜^{1,2} 潘秀珍¹ 唐家琪^{1,2*}

(1. 南京军区军事医学研究所 江苏 南京 210002)

(2. 南京医科大学基础医学院 江苏 南京 210029)

摘要: 利用同源重组基因敲除方法构建猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, *S. suis* 2)中国强毒株 05ZYH33 菌毛骨架蛋白(Backbone protein, BP)编码基因 *SSU2101* 敲除突变株。采用引物特异性 PCR 分析、Southern 杂交及 RT-PCR 等方法鉴定, 证实成功构建了 BP 基因缺失突变株。生物学特性显示, 突变株的菌落形态、溶血活性以及染色特性方面与野生株之间均无明显差异。小鼠致病性试验结果显示, 突变株的毒力比野生株显著减弱。研究结果提示菌毛在 *S. suis* 2 感染致病过程中起重要作用, 为系统研究 *S. suis* 2 菌毛分子装配机制及其生物学功能奠定了基础。

关键词: 猪链球菌 2 型, 菌毛骨架蛋白, 基因敲除, 致病性

Construction and Characterization of Pilus Backbone Gene Knock-out Mutant of *Streptococcus suis* Serotype 2

QIN Yue-Hong^{1,2} WANG Chang-Jun^{1,2} CHEN Hong-Na^{1,2} PAN Xiu-Zhen¹
TANG Jia-Qi^{1,2*}

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

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

Abstract: Based on the principle of homologous recombination, we construct gene knock-out mutant of the pilus backbone gene in *Streptococcus suis* serotype 2 virulent strain 05ZYH33. PCR analysis, Southern hybridization and RT-PCR analysis showed that the target gene was replaced by *Spc*^R cassette. Analysis of biological characteristics showed that there were no differences in mycelial morphology, hemolytic activity and dyeing properties between the mutant and the wild type strain 05ZYH33. Virulence assays with murine model confirmed that the mutant is significantly less virulent than the wild type strain. The results suggest pili plays an important role in the pathogenesis, which laid the foundation for the study of the mechanisms of pilus assembly and biological function in the *S. suis* serotype 2.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2, Pilus backbone, Gene knock-out, Pathogenesis

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30972638, 30730081); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2009042); 南京军区医学科技创新课题(No. 07Z045); 南京军区卫生专业人才培养“122”工程资助项目

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

收稿日期: 2010-02-25; 接受日期: 2010-04-26

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

猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2)是一种重要的人兽共患病原体, 不仅可致猪急性败血症、脑膜炎、关节炎、心内膜炎及急性死亡, 而且可通过伤口等传播途径, 导致人的感染发病和死亡, 对养猪业及相关从业人员均造成严重威胁^[1-2]。特别值得关注的是, 1998 年和 2005 年我国江苏省和四川省分别暴发大规模 *S. suis* 2 感染疫情, 患者出现链球菌中毒性休克综合征(*Streptococcal toxic shock syndrome*, STSS), 病情凶险, 病死率高(62.7%–81.3%), 具体致病机制尚不清楚^[3]。

细菌对宿主细胞的粘附是其定植、侵入机体及其引发宿主致病的关键一步, 菌毛在革兰阴性菌中主要涉及对宿主的黏附和侵袭, 是一个重要的毒力因子^[4]。近几年, 对 A 群链球菌、B 群链球菌和肺炎链球菌的研究发现, 不仅菌毛组分蛋白能够在其动物模型中产生免疫保护作用, 作为疫苗的候选靶标, 而且菌毛在黏附、侵袭和致病过程中也起到关键作用^[5]。

通过对本实验室保存的 *S. suis* 2 中国强毒株 05ZYH33 的全基因组注释分析, 发现在 SrtBCD 基

因簇上游毗邻的表面蛋白 SSU2101 N-末端具有信号肽序列, 中间片段含有特征性菌毛结构蛋白基序(VYPKN)和“E-box”保守基序, C-末端具有 IPXTG 膜锚定基序, 这种结构与多种革兰阳性病原菌的菌毛骨架蛋白特征完全一致, 认为是 *S. suis* 2 中国强毒株 05ZYH33 SrtBCD 菌毛的骨架蛋白(Backbone protein, BP)^[6]。前期研究表明, 菌毛样结构蛋白 SSU2101 具有良好的免疫原性, 对 *S. suis* 2 强致病株感染小鼠具有显著的免疫保护作用^[7]。本研究利用同源重组原理, 对菌毛骨架蛋白编码基因进行敲除获得突变株 ΔBP , 为进一步研究菌毛在 *S. suis* 2 致病机制中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒、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、质粒 DNA 抽提试剂盒、RNA 反转录

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
Bacterial Strains		
05ZYH33	Virulent strain isolated from a dead patient with STSS	Lab collection
ΔBP	05ZYH33 with replacement of BP with <i>Spc^R</i> gene cassette	This study
<i>E. coli</i> DH5 α	Cloning host for maintaining the recombinant plasmids	Promega
Plasmids		
pMD18-T	TA cloning vector, Amp ^R	TaKaRa
pUC18	Cloning vector; Amp ^R	Promega
pSET2	<i>E. coli</i> - <i>S. suis</i> shuttle vector, <i>Spc^R</i>	Takamatsu et al.(2001)
pUC18::BP	A recombinant vector with the background of pUC18, designed for knockout of BP; Amp ^R ; <i>Spc^R</i>	This study
Plasmids		
L1	<u>GAATTC</u> TATAAAATCCCCTACATT	<i>EcoR</i> I
L2	<u>GGATCC</u> TAATTATTACTAGAAAGG	<i>BamH</i> I
R1	<u>CTG</u> CAGTGTATACTCTATTTTA	<i>Pst</i> I
R2	<u>AAGCTT</u> ACAGTTGTTCTACGGGA	<i>Hind</i> III
SPC1	<u>GGATCC</u> GTTTCGTGAATACATGTTATA	<i>BamH</i> I
SPC2	<u>CTG</u> CAGGTTTTCTAAAATCTGAT	<i>Pst</i> I
IN1	ACACGTACACCAGTTCCTTTTCA	/
IN2	GTCAGGAAATTGGTTACACTATTA	/
OUT1	AAGGCTAGTTGACAACGGATAATT	/
OUT2	GACAACAGTATCACCTTCTCGAAC	/
Restriction sites*		
		Upstream border of BP
		Downstream border of BP
		<i>Spc^R</i> gene cassette
		Internal fragment of BP
		For PCR assay

Note: Amp^R: Ampicillin resistant; *Spc^R*: Spectinomycin resistant. Unique restriction sites are underlined.

试剂盒均购于 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒、基因组及 RNA 提取试剂盒为 Promega 公司产品; Todd-Hewitt Broth (THB) 培养基购于 Difco 公司; North & South 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™ 型电穿孔仪及电转杯均为 BIO-RAD 公司产品; Ultraspec2000 型紫外分光光度计为 Pharmacia 公司产品。

1.3 实验动物

BALB/c 雌性小鼠, SPF 级, 4 周龄, 购自军事医学科学院实验动物中心。

1.4 ΔBP 的构建与鉴定

1.4.1 构建重组敲除质粒 pUC18::BP: 以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 分别用引物 L1/L2、R1/R2 进行 PCR 扩增 BP 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, 将它们依次克隆到 pUC18 载体的 *EcoRI*、*BamHI*、*PstI* 和 *HindIII* 4 个多克隆位点上, 形成一个 *Spc^R* 基因两侧具有与 BP 基因上下游同源序列的重组敲除质粒 pUC18::BP, 并送至南京金思特生物技术有限公司进行测序。

1.4.2 基因敲除突变株 ΔBP 的筛选和 PCR 初步鉴定: 参照 Smith 等^[8]的方法制备 *S. suis* 05ZYH33 感受态细胞, 在 2150 V/cm、200 Ω 和 25 μ F 电转参数下, 用构建好的重组质粒电转化 05ZYH33 感受态细胞, 菌液涂布于含 100 mg/L *Spc^R* 的 THB 平板上进行初步筛选, 37°C 孵育 48 h 后, 增殖培养所有的单菌落。先用位于 BP 内部的引物 IN1/IN2 进行 PCR 初次筛选, 疑似阳性菌进一步用引物 SPC1/SPC2、OUT1/SPC2、SPC1/OUT2 进行组合 PCR 鉴定。

1.4.3 基因敲除突变株 ΔBP 的 Southern 杂交及 RT-PCR 鉴定: 为进一步验证敲除株的正确性, 提取基因组进行 Southern 杂交, 在基因水平上对野生型 05ZYH33 和突变株 ΔBP 进行鉴定。提取野生型和 ΔBP 的总 RNA 并进行反转录, 在转录水平上进行 RT-PCR 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, 将过夜培养的突变株和野生型分别接种于 THB 血平板(含 5% 绵羊血)上, 37°C 培养箱孵育 24 h, 观察二者的菌落形态和溶血活性。

1.5.2 Gram 染色: 分别将突变株和野生型接种 THB 培养基(含 10% 胎牛血清)中于 37°C 培养至对数中期, 用接种环取样均匀涂布于载玻片上, 自然晾干后进行常规革兰氏染色, 于显微镜下观察菌落形态。

1.6 小鼠感染实验

从 THB (含 5% 羊血) 平板上挑取单菌落, 转接于 THB (含 10% 灭活小牛血清) 液体培养基中振荡培养 2 代, 取 1 mL 活化的突变株和野生型分别腹腔注射小鼠各 10 只(约 10^8 CFU/只), 并设 THB 阴性对照组 10 只(1 mL/只)。每日 2 次观察记录小鼠发病及死亡情况, 观察 1 周。

1.6.1 统计学分析: 统计学分析用 SPSS15.0 统计软件, 使用 Kaplan-Meier 生存函数分析方法比较小鼠存活率并绘制存活曲线, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 ΔBP 的构建与鉴定

2.1.1 重组敲除质粒 pUC18::BP 的鉴定: 对重组敲除质粒进行组合 PCR (图 1) 及交叉双酶切验证(图 2), 结果显示, 各条带大小均与理论值相符。测序结果亦显示 3 个片段序列及连接顺序正确。

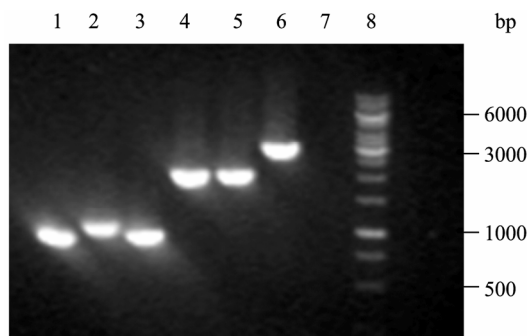


图 1 重组敲除质粒 pUC18::BP 的组合 PCR

Fig. 1 Multiple-PCR analysis of the recombinant plasmid pUC18::BP

Note: 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: PCR products without any primer; 8: 1 kb DNA ladder Marker.

2.1.2 敲除突变株 ΔBP 的筛选及 PCR 初步鉴定: 取 5 μ L 构建好的重组质粒 pUC18::BP 电转化 *S. suis* 05ZYH33 感受态细胞, 转化平板经 37°C 培养 48 h 后, 从平板上挑取单菌落摇菌培养, 对于引物 IN1/IN2 的 PCR 产物为阴性者(图 3), 考虑 BP 基因

已经不存在, 认为是疑似阳性株, 提取基因组进行组合 PCR 验证。如果发生双向同源重组, *Spc^R* 基因将替代 *BP*, 用引物 SPC1/SPC2 进行 PCR 能扩增出 *Spc^R* 基因, 引物 IN1/IN2 不能扩增出目的片段, 引物 OUT1/SPC2 进行 PCR 能扩增出约 2169 bp 的片段, 引物 SPC1/OUT2 进行 PCR 能扩增出 2184 bp 的片段。而在 05ZYH33 中, 用以上引物进行 PCR 都应得到阴性结果, 而用引物 IN1/IN2 能扩增出 478 bp 的目的片段, 结果如图 4 所示。

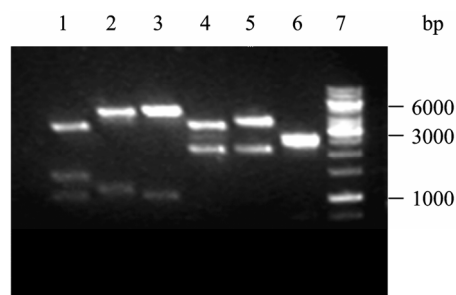


图 2 重组敲除质粒 pUC18::BP 的交叉酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme digesting of the recombinant plasmid pUC18::BP

Note: 1: Digested by *EcoRI* and *BamHI*; 2: Digested by *BamHI* and *PstI*; 3: Digested by *PstI* and *HindIII*; 4: Digested by *EcoRI* and *PstI*; 5: Digested by *BamHI* and *HindIII*; 6: Digested by *EcoRI* and *HindIII*; 7: 1 kb DNA ladder Marker.



图 3 突变株 ΔBP 的初步筛选

Fig. 3 Preliminary PCR screening of gene knock-out mutant of BP

Note: 1-14: Mutant 1-14; 15: Positive control; 16: Negative control; 17: 1 kb DNA ladder marker.

2.1.3 敲除突变株 ΔBP 的 Southern 杂交及 RT-PCR 鉴定: 为进一步验证 ΔBP 的正确性, 通过 Southern 杂交对 ΔBP 基因组上的突变基因进行定位分析, 使用 *BP* 基因中间片段作为标记探针, 结果如图 5 所示, 探针可以与 05ZYH33 基因组杂交出约 8200 bp 的 *Spe I* 单酶切片段, 与双向同源重组的 ΔBP 未出现杂交条带, 表明在基因水平 *BP* 基因已被敲除; 分别提取 05ZYH33 和敲除株 ΔBP 的总

RNA, 以反转录得到的 cDNA 为模板, 以 IN1/IN2 为引物进行 PCR 扩增, 结果如图 6 所示, 在野生型 05ZYH33 中 *BP* 基因正常转录, 而在突变株中 *BP* 基因不能正常转录, 进而在转录水平证实了 *BP* 基因确实已经被敲除。

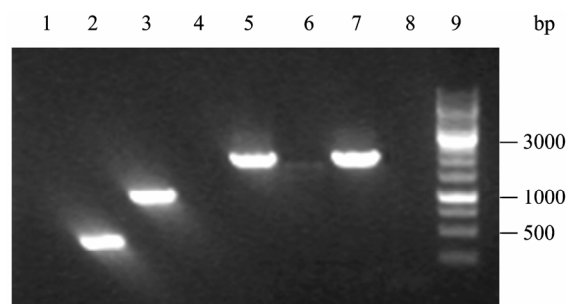


图 4 ΔBP 的组合 PCR 验证

Fig. 4 Multiple-PCR analysis of ΔBP and 05ZYH33

Note: 1: IN1/IN2 PCR amplification using ΔBP genomic DNA as template; 2: IN1/IN2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template; 3: SPC1/SPC2 PCR amplification using ΔBP genomic DNA as template; 4: SPC1/SPC2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template; 5: OUT1/SPC2 PCR amplification using ΔBP genomic DNA as template; 6: OUT1/SPC2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template; 7: SPC1/OUT2 PCR amplification using ΔBP genomic DNA as template; 8: SPC1/OUT2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template; 9: 1 kb DNA ladder marker.

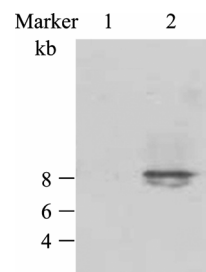


图 5 ΔBP 的 Southern 杂交分析

Fig. 5 Southern hybridization analysis of ΔBP

Note: 1: ΔBP genome/*Spe I*; 2: Wild type strain 05ZYH33 genome/*Spe I*.

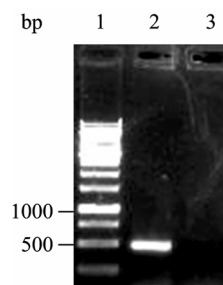


图 6 ΔBP 的 RT-PCR 分析

Fig. 6 RT-PCR analysis of ΔBP

Note: 1: 1 kb DNA ladder marker; 2: IN1/IN2 PCR amplification using cDNA of 05ZYH33; 3: IN1/IN2 PCR amplification using cDNA of ΔBP .

2.2 生物学特性分析

2.2.1 划线培养: 采用分区划线法, 将过夜培养的突变株 ΔBP 与野生型 05ZYH33 接种于 THB 血平板(含 5%绵羊血)上, 37°C 培养箱孵育 24 h 后, 可见二者均长出灰白色、圆形半透明、湿润、表面光滑的细小菌落(直径为 1 mm–2 mm), 菌落周围均有明显的 β -溶血环, 宽度为 1 mm–2 mm。表明与野毒株相比, 突变株的菌落形态和溶血活性没有发生明显变化。

2.2.2 Gram 染色: 取对数生长的突变株 ΔBP 和野毒株 05ZYH33 进行革兰染色, 显微镜下观察发现, 二者均为典型的革兰阳性菌, 菌体形态为圆形或椭圆形, 呈短链状排列, 无明显差异。

2.3 小鼠感染实验

为进一步研究菌毛的缺失是否会影响野毒株 05ZYH33 的致病性, 我们对野生型 05ZYH33 和突变株 ΔBP 的毒力进行了比较。野生型组 10 只小鼠在攻毒 12 h 内全部死亡; 突变株组在攻毒 12 h 内死亡 2 只, 另有一只发病较重, 有结膜炎症状, 48 h 内死亡, 余 7 只一周内状态良好; THB 阴性对照组观察一周, 均无明显发病或异常表现。用 Kaplan-Meier 生存函数分析方法比较小鼠存活率并绘制存活曲线, 结果如图 7 所示, 突变株组与野生型组存活率 P 值 < 0.05 , 说明与野生型相比, 突变株的毒力比野生型明显下降。

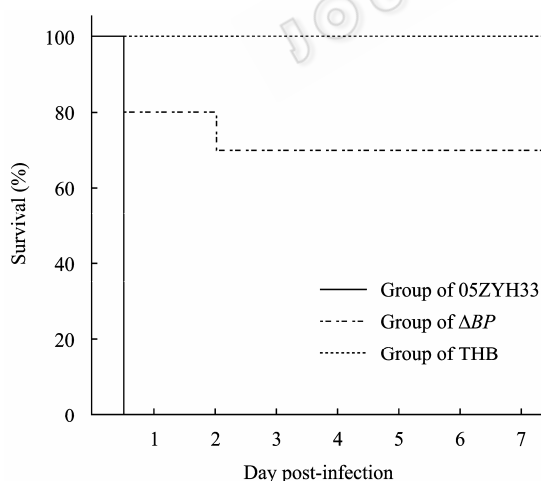


图 7 小鼠生存曲线

Fig. 7 Survival curves for BALB/c mice infected with the wild-type 05ZYH33, ΔBP and THB

3 讨论

猪链球菌 2 型具体的致病机制尚不清楚, 对毒力因子的研究一直是个热点, 目前已知的毒力相关

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 (Sulysin, SLY) 等^[9–10], 其中只有荚膜多糖是唯一被明确的毒力因子, 然而 *S. suis* 2 强毒株、弱毒株及无毒株都有荚膜多糖包被, 提示该因子只能作为 *S. suis* 2 的一种必需毒力成分, 在其致病过程中还需其他因子的参与, 潜在的毒力因子尚有待发现。

黏附及侵入内皮细胞是细菌在宿主体内存活和扩散的重要一步, 菌毛在革兰阴性菌中主要涉及对宿主的黏附和侵袭, 是一个重要的毒力因子。近几年在对革兰阳性菌—白喉棒状杆菌、无乳链球菌、化脓链球菌、肺炎链球菌等的研究中, 发现菌毛在致病过程中也起着黏附、侵袭、共聚合、生物被膜形成和免疫调节等作用^[11]。研究表明有菌毛的肺炎链球菌株与缺失了菌毛岛基因的肺炎链球菌株相比能够更好的黏附于肺脏上皮细胞, 鼻内混合感染小鼠有菌毛的菌株毒力更强, 在组织定殖、引发肺炎和菌血症方面比突变体更具有竞争优势, 并能诱发宿主的促炎症反应^[12]。

关于猪链球菌菌毛的研究, 早在 1990 年加拿大学者 Jacques 等^[13]通过电子显微镜在菌体表面发现存在直径大约为 2 nm, 长 250 nm 的菌毛样结构。本课题组通过对本实验室保存的 *S. suis* 2 中国强毒株 05ZYH33 的全基因组注释分析, 发现了两个在结构特征上与已知革兰阳性菌菌毛编码基因完全一致的基因簇——SrtBCD 和 SrtF 菌毛岛^[6]。研究表明多种革兰阳性病原菌的菌毛骨架蛋白具有相似的肽链结构^[14]——N-末端具有信号肽序列, 中间片段含有特征性菌毛结构蛋白基序 (VYPKN) 和“E-box”保守基序, C-末端具有 IPXTG 膜锚定基序, SrtBCD 基因簇上游毗邻的表面蛋白 SSU2101 也有此结构特征, 被预测为 *S. suis* 2 型中国强毒株 05ZYH33 SrtBCD 菌毛的骨架蛋白。

为了探讨菌毛在 *S. suis* 2 型致病过程中发挥的作用, 本研究利用同源重组基因敲除方法构建了中国强毒株 05ZYH33 菌毛骨架蛋白编码基因敲除株。Southern 杂交及 RT-PCR 结果显示无论在基因水平还是在转录水平上均成功敲除了 *BP* 基因; 生物学特性显示, 突变株的菌落形态、溶血活性以及染色特性方面与野生型之间均无明显差异; 小鼠致病实

验结果说明突变株的毒力比野生型明显下降。鉴于仔猪是 *S. suis* 2 的自然感染宿主,本实验的结果还需要进一步通过仔猪模型加以验证。有研究表明,虽然敲除 B 群链球菌的菌毛骨架蛋白编码基因不影响病原菌的黏附作用,但是降低了病原菌的穿细胞跨膜扩散能力^[15],菌毛在 *S. suis* 2 的致病过程中是如何发挥作用的,对于这个问题,本课题组将在细菌与内皮细胞黏附及侵袭能力、对巨噬细胞的抗吞噬能力、全血存活能力以及电镜下细菌超微结构的改变等方面进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, *et al.* *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun*, 1997, **21**(6): 381–407.
- [2] Lun ZR, Wang QP, Chen XG, *et al.* *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis*, 2007, **7**(3): 201–209.
- [3] Tang J, Wang C, Feng Y, *et al.* Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med*, 2006, **3**(5): e151.
- [4] Merz AJ, So M. Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000(16): 423–457.
- [5] Telford JL, Barocchi MA, Margarit I, *et al.* Pili in Gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 2006, **4**(7): 509–519.
- [6] Wang CJ, Li M, Feng Y, *et al.* The involvement of sortase A in high virulence of STSS-causing *Streptococcus suis* serotype 2. *Arch Microbiol*, 2009, **191**(1): 23–33.
- [7] 秦跃红, 王长军, 董瑞萍, 等. 猪链球菌 2 型菌毛样结构蛋白 SSU2101 原核表达及免疫保护性研究. *微生物学通报*, 2009, **36**(11): 1700–1704.
- [8] Smith HE, Wisselink HJ, Vecht U, *et al.* High-efficiency transformation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2. *Microbiology*, 1995, **141**(pt 1): 181–188.
- [9] Charland N, Harel J, Kobisch M, *et al.* *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology*, 1998, **144**(2): 325–332.
- [10] 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.
- [11] Mandlik A, Swierczynski A, Das A, *et al.* Pili in gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol*, 2008, **16**(1): 33–40.
- [12] Barocchi MA, Ries J, Zoqai X, *et al.* A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *PNAS*, 2006, **103**(8): 2857–2862.
- [13] Jacques M, Gottschalk M, Foiry B, *et al.* Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol*, 1990, **172**(6): 2833–2838.
- [14] Telford JL, Barocchi MA, Margarit I, *et al.* Assembly of pili in gram-positive. *Nat Rev Microbiol*, 2006, **4**(7): 509–519.
- [15] Pezzicoli A, Santi I, Lauer P, *et al.* Pilus backbone contributes to group B streptococcus paracellular translocation through epithelial cells. *J Infect Dis*, 2008, **198**(6): 890–898.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第 1 个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。