

研究报告

猪链球菌 2 型 *Orf207* 基因缺失菌株的构建及其生物学特性检测

梅纪坤, 姜轩, 吴桐, 姜合祥, 朱俊辉, 武增帅, 李丰阳, 李娜*, 雷连成*

吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062

梅纪坤, 姜轩, 吴桐, 姜合祥, 朱俊辉, 武增帅, 李丰阳, 李娜, 雷连成. 猪链球菌 2 型 *orf207* 基因缺失菌株的构建及其生物学特性检测[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 3009-3019.

MEI Jikun, JIANG Xuan, WU Tong, JIANG Hexiang, ZHU Junhui, WU Zengshuai, LI Fengyang, LI Na, LEI Liancheng. Construction of *orf207* gene mutant strain of *Streptococcus suis* type 2 and detection of its biological characterization[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 3009-3019.

摘要:【背景】猪链球菌 2 型(*streptococcus suis* serotype 2, SS2)可引起人、猪的脑膜炎、关节炎及败血症等, 不仅给养猪业带来巨大的经济损失, 同时严重威胁公共卫生安全。本团队前期通过噬菌体展示文库技术发现 *Orf207* 编码蛋白可能参与 SS2 诱导的脑膜炎发生, 然而其在 SS2 致病过程中的具体作用尚不清楚。【目的】探究 *Orf207* 基因对 SS2 致病性的影响。【方法】采用温敏性自杀质粒介导的同源重组系统, 构建 SC19 *Orf207* 基因缺失菌株 $\Delta Orf207$ 及其回补菌株 $C\Delta Orf207$, 系统比较缺失菌株与野生株间在生长特性、形态、组织定殖能力、毒力情况、细胞黏附与侵袭及抗巨噬细胞吞噬能力等生物学特性方面的差异。【结果】与野生株相比, 缺失菌株链长变短, 生长速度略慢; 而且 *Orf207* 缺失显著增加了小鼠的存活率, 降低了细菌在血液、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脑组织的定殖能力和对肺组织的病理损伤并显著减弱 SS2 对 HeLa 细胞的黏附与侵袭能力及抗巨噬细胞吞噬能力。【结论】*Orf207* 基因可以显著降低 SS2 对宿主的致病能力, 本研究结果不仅丰富了 SS2 的致病机制, 也为 SS2 疫苗等研发提供了新靶点。

关键词: 猪链球菌 2 型; *Orf207* 基因; 缺失株; 黏附; 侵袭

资助项目: 国家科技部“十四五”重点研发计划(2021FYD1800405)

This work was supported by the Fourteenth Five-Year Plan Key Research and Development Project of the Ministry of Science and Technology of China (2021FYD1800405).

*Corresponding authors. E-mail: LI Na, vetlina2013@126.com; LEI Lianchen, leiliancheng@163.com

Received: 2022-10-28; Accepted: 2022-12-05; Published online: 2023-01-11

Construction of *Orf207* gene mutant strain of *Streptococcus suis* type 2 and detection of its biological characterization

MEI Jikun, JIANG Xuan, WU Tong, JIANG Hexiang, ZHU Junhui, WU Zengshuai, LI Fengyang, LI Na*, LEI Liancheng*

College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

Abstract: [Background] *Streptococcus suis* type 2 (SS2) may cause meningitis, arthritis, and sepsis in humans and pigs, which not only brings great economic damage to the pig industry but also seriously threatens public health safety. In the previous study, using the phage display library technique, this team found that the protein encoded by *Orf207* may be involved in SS2-induced meningitis; however, its specific role in the pathogenesis of SS2 is still unclear. [Objective] To explore the effect of the *Orf207* gene on SS2 pathogenicity. [Methods] In this study, the homologous recombination system mediated by the thermosensitive suicide plasmid was used to construct the SC19 *Orf207* gene deletion strain $\Delta Orf207$ and its complementing strain $C\Delta Orf207$, after which the differences in biological characteristics such as growth characteristics, colony morphology, tissue colonization capacity, virulence, cell adhesion and invasion, and anti-macrophage phagocytosis between the deletion strain and the wild strain were systematically compared. [Results] Compared to wild strains, the deletion strain had shorter chain length and slower growth rate. Moreover, *Orf207* deficiency significantly increased the survival rate of mice and reduced the colonization of bacteria in the blood, heart, liver, spleen, lung, kidney and brain, alleviating pathological damage to lung tissues. It also remarkably reduced the adhesion and invasion ability of SS2 to Hale cells and its anti-macrophage phagocytosis. [Conclusion] The above results indicate that gene *Orf207* can significantly reduce the pathogenicity of SS2 to the host. The findings of this study enrich the pathogenesis of SS2 and provide a new target for the development of SS2 vaccine.

Keywords: *Streptococcus suis* type 2 (SS2); *Orf207* gene; deletion mutants; adhesion; adhere

猪链球菌病是由 C、D、E、L、R、S 等多种不同群的链球菌引起感染或传染病的总称^[1], 给全球养猪业造成巨大的经济损失。猪链球菌血清型众多, 抗原结构复杂, 截至目前已鉴定出 35 个血清型, 其中毒性、流行性最强的血清型为猪链球菌血清 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)^[2]。SS2 感染后可致宿主脑膜炎、心内膜炎、腹膜炎、关节炎、肺炎、淋巴结脓肿、急性型败血症甚至突然死亡^[3]。尽管人感染猪链球菌病的流行病学在很大程度上仍未确定, 但大多数

病例都与处理、食用未加工的猪产品或者与猪密切接触有关。SS2 也可以感染一般人群^[4-5], 对人类健康造成严重威胁。

SS2 感染的过程直接受到黏附素、毒素和其他蛋白等因素的影响, 也间接受到宿主体内环境、细胞代谢和各种调节过程的影响^[6]。虽然已经确定了几种毒力因子, 包括荚膜多糖、细胞外蛋白因子、溶血素、H 因子结合表面蛋白和腺苷合酶, 但 SS2 发病机制方面仍有许多问题尚不清楚, 有待进一步研究。在对 SS2 毒力因子的

筛选、鉴定过程中, 往往会发现大量假定的毒力因子, 它们有可能在 SS2 感染过程中发挥着重要作用。Wilson 等^[7]使用 LuminxxMAP1 的 STM 分析方法筛选出 22 个假定的毒力基因, 其中包括 *Orf207* 基因。另外, 我们的前期研究也发现, *Orf207* 基因可能参与 SS2 黏附猪脑微血管内皮细胞的过程^[8], 但其在 SS2 致病中的具体作用尚不清楚。本研究通过构建 *Orf207* 基因缺失株及回补株, 并对两者在生长特性、菌株形态、组织定殖能力、宿主致病能力、细胞黏附侵袭及抗吞噬等方面的差异进行比较, 以期为进一步解析 *Orf207* 基因功能、探究 *Orf207* 在 SS2 致病过程中的作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

猪链球菌 2 型 SC19 菌株, 质粒 PSET4S、PSET2, 以及 RAW 264.7、HeLa 细胞均由本实验室保存。20~22 g 的雌性 BALB/c 小鼠(SPF 级)购自辽宁长生生物技术股份有限公司。动物实验遵守吉林大学及国家对于实验动物伦理福利的要求, 在吉林大学动物伦理福利委员会监督下开展,

实验动物伦理福利审查编号为: SY202201009。

高保真 PrimeSTAR DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 连接酶, TaKaRa 公司; 质粒小提试剂盒和 DNA 产物纯化试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 脑心浸出液(BHI)培养基、革兰氏染色试剂盒, 青岛海博公司。PCR 基因扩增仪, 杭州博日科技股份有限公司; 琼脂糖水平电泳仪、凝胶成像分析仪, Bio-Rad 公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 上公布的 SS2 SC19 菌株 *Orf207* 基因序列(CP020863.1)设计多对引物, 分别用于 *Orf207* 基因的敲除、验证与回补, 引物序列见表 1, 由库美公司合成。

1.3 缺失株 $\Delta Orf207$ 的构建

以 SS2 SC19 菌株为模板, 采用引物对 P1/P2、P3/P4 分别扩增 *Orf207* 基因上、下游同源臂的 1 000 bp 目的片段。PCR 反应体系 (50 μ L): 2 \times PrimeSTAR Premix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

表 1 缺失株及回补株引物信息

Table 1 Primer information of the deletion strain and the complemented strain

引物名称	序列	产物大小
Primer name	Sequences (5'→3')	Product size (bp)
P1	CCCAAGCTTATAGGGGAGAAAATCTGGGGAAAC	1 000
P2	AAATAAATTCTGCTATAAATATTAAAGGATAATTATATCAAAAAGAGA	
P3	TCTCTTTTGTATATAATTATCCTTTAATATTTATAGCAGAATTTATTT	1 000
P4	CCGGAATTCTACACATGTCCACTGCAGACATAG	
P5	AAAACGTCAGGATGGAAAAAATTATCATTACAG	930
P6	CCGGAATTCTTATTTAACCTTATTGCG	
X	TGCTTGATAGGTTTGAAAATTAGCC	1 430*/500**
Y	TTTTCCATGTGGAAACCTAGTGC	
E	TATGATGGACAATATCAAACCGTTTAT	500
F	CATGTTTCATCTAATTCTGACAGCTTG	

*: SC19 扩增产物; **: $\Delta Orf207$ 扩增产物

*: SC19 product size; **: $\Delta Orf207$ product size.

之后将扩增的片段以 P1/P4 为引物对进行重叠延伸 PCR, 获得上、下游同源臂的连接产物。1%琼脂糖凝胶电泳后经胶回收试剂盒回收。用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 同时双酶切胶回收产物与温敏性自杀质粒 PSET4S, 并用 DNA 产物纯化试剂盒回收核酸, T4 DNA 连接酶连接后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 通过壮观霉素(50 μ g/mL)抗性筛选含有目的质粒的菌落, 挑取疑似菌落进行扩大培养, 用试剂盒提取质粒, 进行 PCR 及测序鉴定。将鉴定为阳性的重组质粒命名为 PSET4S- Δ Orf207, 然后电转入制备的 SS2 SC19 感受态细胞中, 参考文献[9-10]筛选 Orf207 基因缺失菌株, 经 PCR 及测序验证后的缺失株命名为 Δ Orf207。

1.4 回补株 C Δ Orf207 的构建

以 SS2 SC19 菌株为模板, 利用引物对 P5/P6 扩增 Orf207 基因。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times PrimeSTAR Premix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。经过限制性内切酶 *Pst* I 和 *Eco*R I 双酶切后, 连接至 PSET2 表达质粒上, 构建回补质粒 PSET2-Orf207, PCR 及测序验证后, 将其电转入 SS2 Δ Orf207 缺失株中, 构建回补菌株 C Δ Orf207。

1.5 WT、 Δ Orf207、C Δ Orf207 菌株生长曲线的测定

将 WT、 Δ Orf207、C Δ Orf207 单菌落接种到 BHI 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜。次日分别转接到新鲜的 BHI 液体培养基中, 保证起始 OD₆₀₀ 均为 0.02。37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床上孵育, 每隔 1 h 取等量菌液用分光光度计读取 OD₆₀₀ 值, 共测定 12 h, 根据 OD₆₀₀ 值绘制生长曲线, 比较生长速率。

1.6 细菌形态观察

WT、 Δ Orf207、C Δ Orf207 接种至 BHI 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养至对数生长期(OD₆₀₀ 为 0.8), 无菌 PBS 洗涤 3 次, 分别取 1 μ L 涂布于载玻片上, 进行革兰氏染色, 然后在油镜下观察细菌形态。

1.7 Orf207 基因缺失对 SS2 致病性的影响

1.7.1 感染 WT、 Δ Orf207、C Δ Orf207 菌株后小鼠存活率的测定

将 3 株菌(WT、 Δ Orf207、C Δ Orf207)培养至对数生长期(OD₆₀₀ 为 0.8), 无菌 PBS 洗涤 3 次, 将菌液浓度调整至 5×10^8 CFU/100 μ L。将 40 只 20–22 g 的雌性 BALB/c 小鼠平均分为 4 组, 分别腹腔注射 WT、 Δ Orf207、C Δ Orf207 菌液和生理盐水, 每只小鼠注射 100 μ L。对小鼠进行连续 7 d 的健康观察, 并统计小鼠的死亡情况。

1.7.2 感染 WT、 Δ Orf207、C Δ Orf207 菌株后小鼠血液、组织中载菌量的测定

将 24 只 20–22 g 的雌性 BALB/c 小鼠平均分为 4 组(3 组试验组和 1 组对照组), 上述 1.7.1 的细菌培养物洗涤后调整菌液浓度至 1×10^8 CFU/100 μ L, 试验组每只小鼠腹腔注射 100 μ L 菌液, 对照组给予相同剂量的生理盐水。攻毒 72 h 后, 眼球采血装于加抗凝素(肝素)的 EP 管中, 采用颈椎脱臼法处死, 解剖, 心、肝、肾、肺、脾和脑各取 0.1 g, 放入 2 mL EP 管中, 按每 0.1 g 组织加 300 μ L 无菌 PBS, 研磨至匀浆状。对各组织匀浆进行 10^1 、 10^2 倍稀释, 最后从原管及倍比稀释的管中各取 100 μ L 涂于 BHI 平板, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日取出平板数菌落计数。

1.7.3 感染小鼠组织病理变化观察

将上述 1.7.2 中各组小鼠解剖的另一部分脑和肺组织, 经甲醛固定后用酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 浸蜡、包埋, 制作石蜡切片。切片脱蜡覆水后放入 Harris 苏木素染 3–8 min, 0.6%氨水返蓝, 流水冲洗后再放入伊红染液中染色 1–3 min。

最后脱水封片,显微镜镜检,观察组织器官病理变化。

1.8 *Orf207* 基因缺失对 SS2 黏附、侵袭细胞影响的检测

在 6 孔板中将 HeLa 细胞培养至约 80% 融合度,用无菌 PBS 洗涤 3 次,备用;将 3 株菌(WT、 $\Delta Orf207$ 、 $C\Delta Orf207$)培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.8),以无菌 PBS 洗涤 3 次,用无血清无抗生素 1640 培养基重悬菌体。以感染复数 $MOI=50$ 感染 HeLa 细胞,37 °C 孵育 1 h。弃去培养基,经无菌 PBS 洗涤 3 次后,每孔加入含有 0.5% Triton 的细胞培养基 1 mL,37 °C 孵育 15 min, 10^2 、 10^3 倍稀释以后涂布到 BHI 平板上,37 °C 培养过夜,计算菌落数量(此为细菌总数)。侵袭实验是在细菌侵染 HeLa 细胞后(方法及条件同上),弃去培养基,用无菌 PBS 洗涤 3 次,每孔加入含有庆大霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)的细胞培养基 1 mL,37 °C 孵育 1 h,再用无菌 PBS 洗涤 5 次,加入 1 mL 0.5% Triton 裂解后进行 10^1 、 10^2 倍稀释,各取 100 μL 涂布到 BHI 平板上,37 °C 培养过夜,计算菌落数量(侵袭的细菌数)。黏附的细菌数=细菌总数-侵袭的细菌数。每个菌株做 3 组平行实验。

1.9 *Orf207* 基因缺失对 SS2 抗细胞吞噬作用的测定

将 3 株菌(WT、 $\Delta Orf207$ 、 $C\Delta Orf207$)培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.8),以感染复数 $MOI=20$ 感染 RAW 264.7 细胞,37 °C 孵育 1 h。用无菌 PBS 洗涤 3 次后,每孔加入含有庆大霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)的细胞培养基 1 mL,37 °C 孵育 45 min,再用无菌的 PBS 洗涤 5 次,每孔加入 1 mL 预冷的去离子水,裂解细胞 15–20 min,经 10^1 、 10^2 倍稀释以后,各取 100 μL 涂布到 BHI 平板上,37 °C 培养过夜,计算菌落数量。

2 结果与分析

2.1 $\Delta Orf207$ 缺失株和 $C\Delta Orf207$ 回补株的构建

将重组质粒 PSET4S- $\Delta Orf207$ (图 1A)电转入 SS2 SC19 后,通过温度和壮观霉素抗性进行 $\Delta Orf207$ 缺失株的初步筛选。对挑取的疑似缺失株进行 PCR 鉴定,以外部引物对 X/Y 和内部引物对 E/F (表 1)进行检测。结果如图 1B 所示,野生株扩增片段大小分别为 1 430 bp 和 500 bp, $\Delta Orf207$ 缺失株扩增片段大小分别为 500 bp、无条带,表明 $\Delta Orf207$ 缺失株构建成功。同时,对疑似缺失株进行 PCR 鉴定,可见约 930 bp 的基因片段(图 1C),表明 $C\Delta Orf207$ 回补株构建成功。

2.2 *Orf207* 基因的缺失对 SS2 生长的影响

通过每小时测定菌液 OD_{600} 值,绘制 WT、 $\Delta Orf207$ 和 $C\Delta Orf207$ 的生长曲线,结果显示,与 WT 相比, $\Delta Orf207$ 菌株在 BHI 培养基中的生长速度略慢,但无显著差异($P>0.05$) (图 2)。

2.3 *Orf207* 基因影响 SS2 的链长

对 WT、 $\Delta Orf207$ 和 $C\Delta Orf207$ 菌株进行革兰氏染色,显微镜下观察菌株的形态及链长。镜检结果显示,3 株菌均被染为蓝紫色,形态上无明显区别,但 $\Delta Orf207$ 菌株链长变短(图 3)。

2.4 *Orf207* 基因缺失降低 SS2 的致病性

WT、 $\Delta Orf207$ 和 $C\Delta Orf207$ 菌株经腹腔注射感染小鼠,观察 7 d 内小鼠存活情况。结果如图 4A 所示,感染 WT 菌株的小鼠在感染后第 1 天死亡 6 只,第 2 天死亡 4 只,存活率为 0;感染 $\Delta Orf207$ 菌株的小鼠在感染后第 1 天死亡 1 只,之后再无死亡,存活率为 90%;而 $C\Delta Orf207$ 菌株感染组小鼠在感染后第 1 天死亡 1 只,第 2 天死亡 3 只,存活率为 60%。表明 *Orf207* 基因的缺失导致 SS2 对小鼠的致病能力减弱。

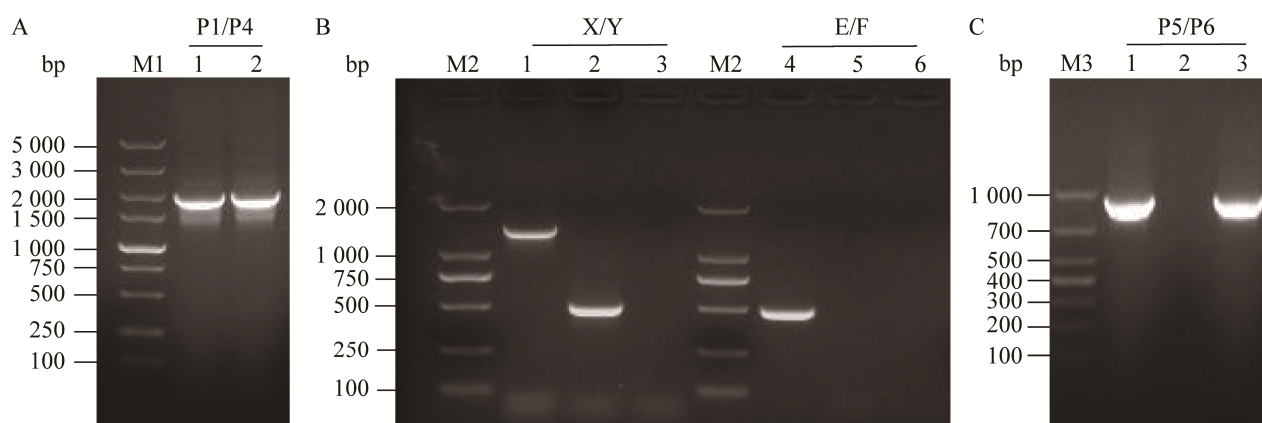


图1 $\Delta Orf207$ 和 $C\Delta Orf207$ 菌株 PCR 鉴定结果 A: PSET4S- $\Delta Orf207$ 重组质粒验证(M1: DL5000 DNA Marker; 1、2: PSET4S- $\Delta Orf207$). B: $\Delta Orf207$ 缺失株验证(M2: DL2000 DNA Marker; 1、4: SS2 SC19; 2、5: $\Delta Orf207$; 3、6: 阴性对照). C: $C\Delta Orf207$ 菌株验证(M3: DL1000 DNA Marker; 1: SS2 SC19; 2: 阴性对照; 3: $C\Delta Orf207$)

Figure 1 Result of PCR identification of the deletion and the complemented strain. A: PSET4S- $\Delta Orf207$ identification result (M1: DL5000 DNA Marker; 1, 2: PSET4S- $\Delta Orf207$). B: $\Delta Orf207$ identification result (M2: DL2000 DNA Marker; 1, 4: SS2 SC19; 2, 5: $\Delta Orf207$; 3, 6: Negative control). C: $C\Delta Orf207$ identification result (M3: DL1000 DNA Marker; 1: SS2 SC19; 2: Negative control; 3: $C\Delta Orf207$).

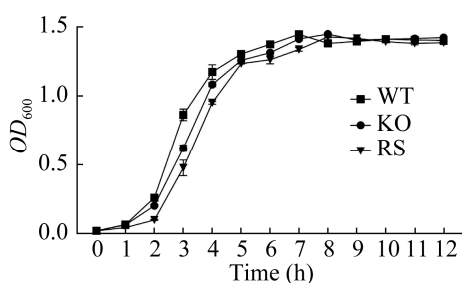


图2 生长曲线测定

Figure 2 Growth curves determination. WT: SC19; KO: $\Delta Orf207$; RS: $C\Delta Orf207$. The same below.

进一步将 WT、 $\Delta Orf207$ 和 $C\Delta Orf207$ 菌株按 1×10^8 CFU/只剂量分别腹腔注射感染小鼠, 在接种 72 h 后统计小鼠血液和各组织中的菌载量。通过活菌计数发现 $\Delta Orf207$ 在血液、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和脑组织的菌量都远低于 WT 菌株(图 4B–4H)。进一步说明缺失 *Orf207* 基因后, SS2 菌株在血液和各器官的定殖能力明显低于 WT, 证实了 *Orf207* 基因可增强 SS2 对小鼠的致病能力。

2.5 组织切片病理变化

小鼠肺脏和脑组织病理变化如图 5 所示。WT 菌株感染后, 可见细支气管内有纤维素渗出(红色箭头), 肺泡完整结构被破坏(黑色箭头), 肺泡壁增厚(蓝色箭头), 间质内有出血充血(黄色箭头), 脑膜上有散在的出血点(绿色箭头); 而 $\Delta Orf207$ 菌株感染后, 小鼠肺脏和脑组织无明显病理变化。

2.6 *Orf207* 基因可增强 SS2 对 HeLa 细胞的黏附、侵袭

将 3 株菌分别与 HeLa 细胞共培养, 利用 BHI 琼脂平板计数的方法, 比较 WT、 $\Delta Orf207$ 和 $C\Delta Orf207$ 菌株对细胞的黏附率与侵袭率。结果显示, 与 WT 菌株相比, $\Delta Orf207$ 菌株对 HeLa 细胞的侵袭率极显著降低($P < 0.01$), 黏附率也显著降低($P < 0.05$); $C\Delta Orf207$ 菌株的黏附与侵袭能力部分恢复(图 6A、6B)。这表明 *Orf207* 基因的缺失降低了 SS2 黏附与侵袭细胞的能力。

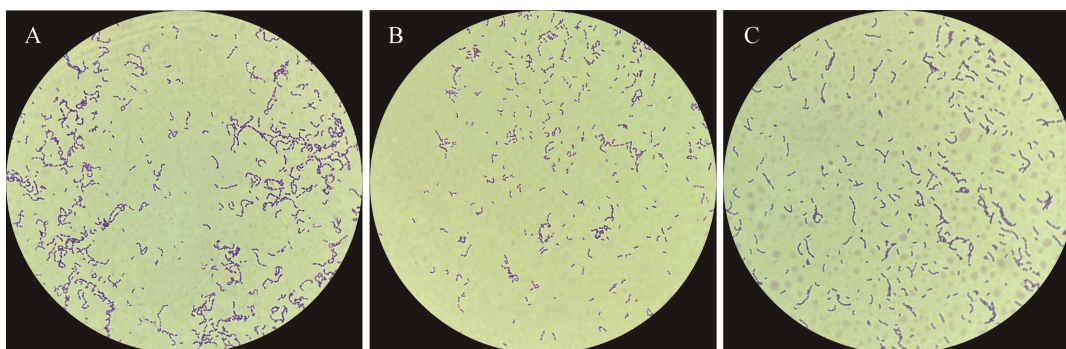
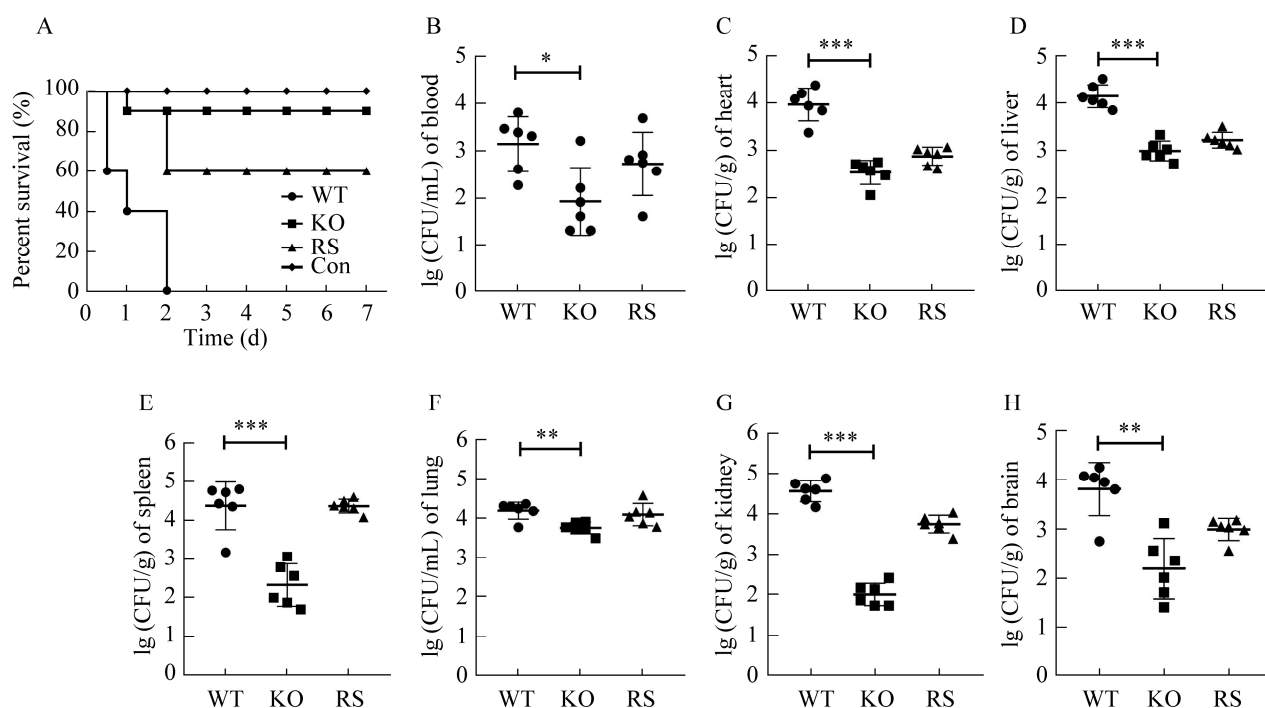


图 3 革兰氏染色结果(1 000×)

Figure 3 The result of Gram's dye (1 000×). A: WT. B: $\Delta Orf207$. C: $C\Delta Orf207$.图 4 *Orf207* 基因缺失对 SS2 致病性的影响 A: 小鼠存活率. B-H: 血液、组织菌载量. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$. 下同Figure 4 Effects of *Orf207* gene deletion on SS2 pathogenicity. A: Mouse survival rate. B-H: Bacterial load of blood and tissue. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$. The same below.

2.7 *Orf207* 基因增加 SS2 抗巨噬细胞吞噬作用
与小鼠腹腔巨噬细胞 RAW 264.7 细胞共培养 1 h 的结果显示(图 7), RAW 264.7 细胞对

$\Delta Orf207$ 菌株的吞噬率达到 41.2%, 显著高于对 WT 组的吞噬率($P<0.001$).表明 *Orf207* 基因增加 SS2 抗巨噬细胞吞噬作用。

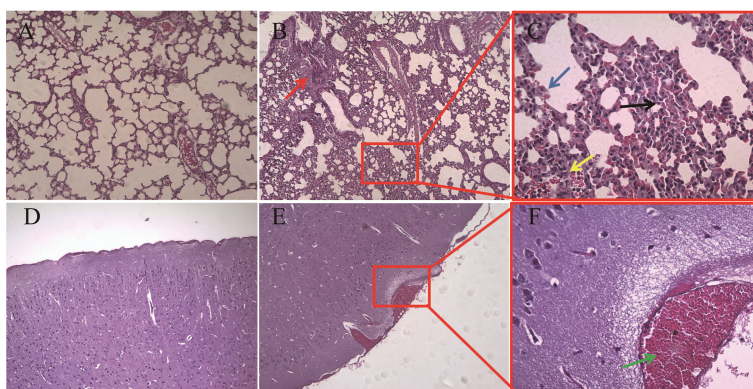


图 5 小鼠组织病理切片的显微观察结果 A–C: 肺组织. D–F: 脑组织[A、D: $\Delta Orf207$ 感染组(100×). B、E: WT 感染组(100×). C、F: WT 感染组(400×)]. 图中箭头所指为组织病变部位

Figure 5 Microscopic observation of mouse histopathological sections. A–C: Lung. D–F: Brain (A, D: $\Delta Orf207$ challenge group (100×). B, E: Wild type challenge group (100×). C, F: Wild type challenge group (400×)). The arrows in the figure above point to the tissue lesion.

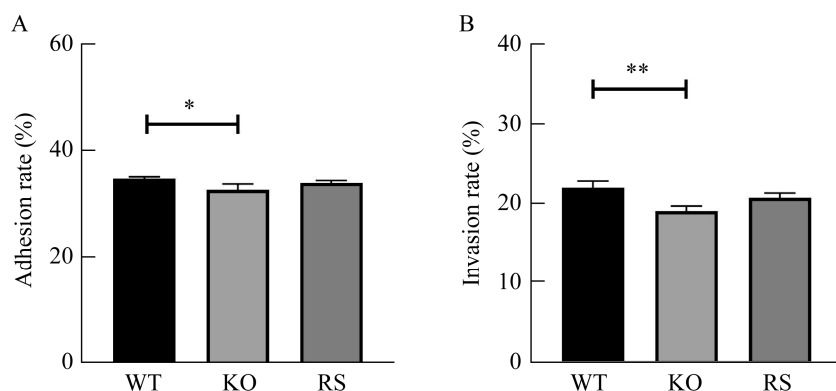


图 6 $\Delta Orf207$ 菌株对 HeLa 细胞黏附、侵袭的结果 A: 对 HeLa 细胞的黏附. B: 对 HeLa 细胞的侵袭
Figure 6 Results of adhesion and invasion of $\Delta Orf207$ to HeLa cells. A: Adhesion to HeLa cells. B: Invasion to HeLa cells.

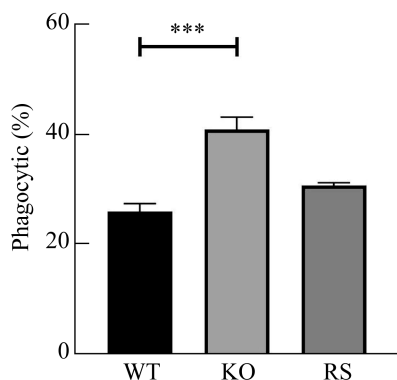


图 7 *Orf207* 基因缺失对 SS2 抗巨噬细胞 RAW 264.7 吞噬的影响

Figure 7 Effect of *Orf207* gene deletion on anti-macrophage RAW 264.7 phagocytosis of SS2.

3 讨论与结论

SS2 被认为是一种人兽共患病病原, 近年来在包括越南、中国、美国、加拿大和欧洲地区许多国家均有报道, 猪链球菌感染人类的事件也屡见不鲜^[11], 而几乎所有报道的人类猪链球菌感染均由血清 2 型菌株引起。在 SS2 感染诱导宿主发病的各个环节中, 猪链球菌各种毒力因子都发挥着不同的作用^[12]。为了更好地预防和治疗 SS2 的感染, 进一步揭示 SS2 毒力基因的致病机理十分必要。

在筛选、鉴定假定的 SS2 毒力因子过程中,通过构建相应基因的敲除突变株并检测其生物学特性,可较为直接地观察到该假定的毒力因子是否在 SS2 致病过程中发挥作用,以及具体发挥何种作用。与 SS2 野生株相比,*Suilysin* 基因突变株对内皮细胞黏附率和毒性作用显著降低,腹腔感染小鼠后其致死能力也显著下降^[13]。SS2 细胞壁 LTA D-alanylation *DeltatA* 基因及细胞壁锚定蛋白 LPXTG *SrtA* 基因敲除后,对脑微血管内皮细胞的黏附和侵袭程度均明显低于野生型菌株^[14-15]。敲除 SS2 的 *SSU0587* 基因会导致对内皮细胞的黏附能力和自身 β -半乳糖苷酶活性丧失,但对细胞的侵袭及小鼠感染模型中的毒力无明显的影响^[16]。

U 族 32 肽酶家族(U32)蛋白在包括龈沟产线菌、鼠伤寒沙门氏菌、短小芽孢杆菌等一些致病菌中^[17-19]被发现有助于细菌的毒力并可参与细菌的感染。根据序列同源性比较分析发现,*Orf207* 基因编码假定的 U32 蛋白,这表示其可能也参与病原菌与宿主的相互作用,但其在 SS2 对宿主的致病过程中发挥的作用尚不清楚。

为了进一步研究 *Orf207* 基因与 SS2 致病性之间的关系,本研究通过温敏型穿梭自杀质粒敲除 SS2 强毒株 SC19 的 *Orf207* 基因,构建了 *Orf207* 缺失突变株 $\Delta Orf207$,同时还构建了 *Orf207* 基因的回补菌株 $C\Delta Orf207$ 。通过比对分析 SC19 WT 和 $\Delta Orf207$ 菌株的形态及其生长速率发现,*Orf207* 基因缺失后细菌链长变短,生长速度稍微慢于野生 SC19 菌株,这说明 *Orf207* 基因有可能会影响细菌的生长过程,但具体的原因尚不清楚。在 SS2 感染过程中,通过表达多种毒力蛋白,协同构成完全毒力^[20]。在转座突变 *Orf207* 基因后发现,SS2 *Orf207* 基因突变体在 CF-1 小鼠和猪模型上有一定的减毒效果^[7]。在本研究中,通过 BALB/c 小鼠感染模型,我们

证明了 *Orf207* 基因是 SS2 完全毒力的必要条件。所有感染 WT 菌株的小鼠均在 48 h 内死亡,而 $\Delta Orf207$ 菌株感染后的小鼠未观察到明显的临床症状,致死性基本丧失。这与 Wilson 等^[7]插入失活突变的结果一致,都证实了 *Orf207* 基因突变后 SS2 的毒力会降低。对感染小鼠组织进行病理学观察分析发现,*Orf207* 基因的缺失极大地减轻了 SS2 对肺脏和脑组织的破坏程度。同时, $\Delta Orf207$ 菌株与 WT 菌株在血液和不同组织中的数量存在明显差异,这表明 *Orf207* 基因的缺失可能使 SS2 在不同组织中的生长和定殖能力受到抑制。

细菌的黏附是细菌定殖于宿主组织器官和持续性存在的关键起始步骤^[21],其通过荚膜、菌毛等黏附性结构以及表达其他多种表面蛋白来实现。最近,在 SS2 黏附或侵袭过程中起关键作用的几种蛋白质被鉴定出来,如 GADPH、烯醇化酶等^[22-23]。在本研究中,我们评价了 *Orf207* 基因对 SS2 黏附和侵袭能力的影响。我们发现 *Orf207* 基因的缺失显著减弱了 SS2 对 HeLa 细胞的黏附与侵袭。这是首次揭示 *Orf207* 基因在调节 SS2 的黏附和侵袭能力方面的作用。另外, $\Delta Orf207$ 菌株黏附能力显著下降,可能是其毒力减弱的重要原因。类似地,维罗尼氏单胞菌的 U32 胶原酶基因 *acg* 缺失后对细胞的黏附和侵袭能力也显著降低,其毒性仅为野生株的 40%左右^[24]。

免疫细胞可通过识别猪链球菌并产生各种细胞因子来协调机体对病原体的清除,而猪链球菌中一些与免疫逃逸有关的毒力因子,可通过拮抗或掩蔽激活免疫细胞的成分来保护其免受免疫细胞的吞噬作用^[25-26]。我们发现,相较于 WT 菌株, $\Delta Orf207$ 菌株抗 RAW 264.7 细胞吞噬能力显著降低,说明 *Orf207* 基因缺失后,SS2 更易被免疫细胞所识别、摄取、清除,这可能与其在

血液、组织中的数量减少密切相关,表明其在抵抗宿主免疫清除中发挥了重要作用,但这还需要进一步的研究进行验证。在本试验中,回补菌株 *CΔOrf207* 的所有生物学特性指标均未达到与野生株类似的水平,这可能是由于 PSET2 质粒在 SS2 中的扩增效率不高,影响到相应蛋白的表达,进而影响到回补株中 *Orf207* 基因相关功能的行使。在后续试验中,我们将通过对相应质粒进行改造来解决这一问题。

总而言之,本研究结果表明 U32 家族基因 *Orf207* 是一个新的候选毒力基因,有助于 SS2 的毒力,其可能参与 SS2 的黏附和侵袭过程,影响 SS2 抵抗免疫系统的清除作用,在 SS2 的致病过程中发挥巨大的作用。

REFERENCES

- [1] GOYETTE-DESJARDINS G, AUGER JP, XU JG, SEGURA M, GOTTSCHALK M. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2014, 3(1): 1-20.
- [2] FAN HJ. Advances in pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(12): 2834-2847.
- [3] DOMÍNGUEZ-PUNARO MC, SEGURA M, PLANTE MM, LACOUTURE S, RIVEST S, GOTTSCHALK M. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection[J]. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md: 1950), 2007, 179(3): 1842-1854.
- [4] SEGURA M. *Streptococcus suis* research: progress and challenges[J]. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 2020, 9(9): 707.
- [5] HLEBOWICZ M, JAKUBOWSKI P, SMIATACZ T. *Streptococcus suis* meningitis: epidemiology, clinical presentation and treatment[J]. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N Y), 2019, 19(8): 557-562.
- [6] FITTIPALDI N, SEGURA M, GRENIER D, GOTTSCHALK M. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*[J]. *Future Microbiology*, 2012, 7(2): 259-279.
- [7] WILSON TL, JEFFERS J, RAPP-GABRIELSON VJ, MARTIN S, KLEIN LK, LOWERY DE, FULLER TE. A novel signature-tagged mutagenesis system for *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 122(1/2): 135-145.
- [8] LIU HT, ZHU S, SUN YY, LI N, GU JM, SUN CJ, FENG X, HAN WY, JIANG JX, LEI LC. Selection of potential virulence factors contributing to *Streptococcus suis* serotype 2 penetration into the blood-brain barrier in an *in vitro* Co-culture model[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(1): 161-170.
- [9] TAKAMATSU D, OSAKI M, SEKIZAKI T. Construction and characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors[J]. *Plasmid*, 2001, 45(2): 101-113.
- [10] TAKAMATSU D. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*[J]. *Plasmid*, 2001, 46(2): 140-148.
- [11] HUONG VTL, HA N, HUY NT, HORBY P, NGHIA HDT, THIEM VD, ZHU XT, HOA NT, HIEN TT, ZAMORA J, SCHULTSZ C, WERTHEIM HFL, HIRAYAMA K. Epidemiology, clinical manifestations, and outcomes of *Streptococcus suis* infection in humans[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(7): 1105-1114.
- [12] SEGURA M, FITTIPALDI N, CALZAS C, GOTTSCHALK M. Critical *Streptococcus suis* virulence factors: are they all really critical?[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(7): 585-599.
- [13] ALLEN AG, BOLITHO S, LINDSAY H, KHAN S, BRYANT C, NORTON P, WARD P, LEIGH J, MORGAN J, RICHES H, EASTTY S, MASKELL D. Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(4): 2732-2735.
- [14] FITTIPALDI N, SEKIZAKI T, TAKAMATSU D, HAREL J, de la CRUZ DOMÍNGUEZ-PUNARO M, von AULOCK S, DRAING C, MAROIS C, KOBISCH M, GOTTSCHALK M. D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(8): 3587-3594.
- [15] VANIER G, SEKIZAKI T, DOMÍNGUEZ-PUNARO MC, ESGLEAS M, OSAKI M, TAKAMATSU D, SEGURA M, GOTTSCHALK M. Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased

- interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 127(3/4): 417-424.
- [16] TANG YL, ZHANG XY, YIN YL, HARDWIDGE PR, FANG WH. *Streptococcus suis* type 2 SSU0587 protein is a beta-galactosidase that contributes to bacterial adhesion but not to virulence in mice[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2014, 76(7): 1055-1059.
- [17] CHIOMA O, ARUNI AW, MILFORD TA, FLETCHER HM. *Filifactor alocis* collagenase can modulate apoptosis of normal oral keratinocytes[J]. *Molecular Oral Microbiology*, 2017, 32(2): 166-177.
- [18] CARLSON SA. SlyA regulates the collagenase-mediated cytopathic phenotype in multiresistant *Salmonella*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2005, 38(4): 181-187.
- [19] WU Q, LI C, LI CL, CHEN H, SHULIANG L. Purification and characterization of a novel collagenase from *Bacillus pumilus* col-J[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(1): 129.
- [20] FENG YJ. Uncovering newly emerging variants of *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent[J]. *Trends in Microbiology*, 2010, 18(3): 124-131.
- [21] KLEMM P, VEJBORG RM, HANCOCK V. Prevention of bacterial adhesion[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(2): 451-459.
- [22] FENG YJ, PAN XZ, SUN W, WANG CJ, ZHANG HM, LI XF, MA Y, SHAO ZQ, GE JC, ZHENG F, GAO GF, TANG JQ. *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2009, 200(10): 1583-1592.
- [23] BRASSARD J. Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin[J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 102(1/2): 87-94.
- [24] HAN HJ, TAKI T, KONDO H, HIRONO I, AOKI T. Pathogenic potential of a collagenase gene from *Aeromonas veronii*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2008, 54(1): 1-10.
- [25] BLEUZÉ M. *In vitro* characterization of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) production by dendritic cells and macrophages during *Streptococcus suis* infection[J]. *Immunobiology*, 2020, 225(4): 151979.
- [26] AUGER JP, SANTINÓN A, ROY D, MOSSMAN K, XU JG, SEGURA M, GOTTSCHALK M. Type I interferon induced by *Streptococcus suis* serotype 2 is strain-dependent and may be beneficial for host survival[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1039.