

## 研究报告

## 糖基水解酶参与猪链球菌 2 型的致病作用

范靖妍<sup>#</sup>, 张锦鹏<sup>#</sup>, 曹江东, 姜合祥, 邓思敏, 杨杨<sup>\*</sup>, 宋厚辉<sup>\*</sup>

浙江农林大学 动物科技学院 动物医学院 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室 动物健康互联网检测技术浙江省工程研究中心 浙江省动物医学与健康国际科技合作基地“一带一路”同一健康和食品安全国际联合实验室 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 浙江 杭州 311300

范靖妍, 张锦鹏, 曹江东, 姜合祥, 邓思敏, 杨杨, 宋厚辉. 糖基水解酶参与猪链球菌 2 型的致病作用[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 643-653.

FAN Jingyan, ZHANG Jinpeng, CAO Jiandong, JIANG Hexiang, DENG Simin, YANG Yang, SONG Houhui. Glycosyl hydrolase contributes to the pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 643-653.

**摘要:**【背景】猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)是一种重要的人畜共患病原菌,可引起猪和人的严重感染,导致肺炎和感染性休克,甚至死亡。【目的】尽管多数毒力因子被相继发现,但其致病机制仍不清晰,寻找新的毒力因子或毒力相关基因进一步解析其致病机理依旧迫在眉睫。【方法】基于前期 SS2 的 Tn917 转座子插入突变体库的大蜡螟幼虫筛选结果,选取了一株致病性显著下降的插入突变体,其突变基因鉴定为 B9H01\_RS10315,编码糖基水解酶(glycosyl hydrolase, GhA)。通过构建 *ghA* 基因的缺失株( $\Delta ghA$ )及回补株( $C\Delta ghA$ ),进行生长观察和体内体外致病力试验,探究 *ghA* 参与的致病作用。【结果】相较于野生株,缺失株  $\Delta ghA$  表现出一定的生长缺陷,大蜡螟幼虫 24 h 致死率下降 25%,对上皮细胞的黏附能力下降约 50%,在全血中存活能力下降约 35%,以及在细菌对细胞 10 倍和 50 倍的感染比下被吞噬细胞的吞噬增加约 100%和 200%。【结论】猪链球菌 2 型糖基水解酶 GhA 有助于细菌的生长,并通过促进细菌黏附、血液存活、抗吞噬能力等参与其致病过程。

**关键词:** 猪链球菌; 致病作用; 毒力基因; 糖基水解酶

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1801000); 浙江农林大学学校科技发展基金(2023LFR137); 国家自然科学基金(32272951)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1801000), the Research and Development Fund for Zhejiang A&F University (2023LFR137), and the National Natural Science Foundation of China (32272951).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding authors. E-mail: SONG Houhui, songhh@zafu.edu.cn; YANG Yang, yyang@zafu.edu.cn

Received: 2024-08-31; Accepted: 2024-12-30; Published online: 2025-01-09

## Glycosyl hydrolase contributes to the pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2

FAN Jingyan<sup>#</sup>, ZHANG Jinpeng<sup>#</sup>, CAO Jiangdong, JIANG Hexiang, DENG Simin, YANG Yang<sup>\*</sup>, SONG Houhui<sup>\*</sup>

Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Provincial Engineering Research Center for Animal Health Diagnostics & Advanced Technology, Zhejiang International Science and Technology Cooperation Base for Veterinary Medicine and Health Management, The Belt and Road International Joint Laboratory for One Health and Food Safety, China-Australia Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, College of Animal Science and Technology, College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

**Abstract:** [Background] *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) is a significant zoonotic pathogen responsible for severe infections in pigs and humans, resulting in pneumonia, septic shock, and even death. [Objective] Despite the diverse virulence factors identified, the underlying pathogenic mechanism of SS2 remains unclear. Therefore, it is urgent to search for new virulence factors or virulence-related genes for elucidating the pathogenic mechanism. [Methods] An insertion mutant with significantly attenuated pathogenicity in *Galleria mellonella* larvae was selected from the Tn917 transposon insertion mutant library of SS2, and its mutated gene was identified as B9H01\_RS10315, which encoded a glycosyl hydrolase (GhA). An isogenic deletion mutant of *ghA* ( $\Delta ghA$ ) and its complementary strain ( $C\Delta ghA$ ) were constructed, and the growth and pathogenicity of the mutants were determined to reveal the pathogenic role of *ghA*. [Results] Compared with the wild type,  $\Delta ghA$  displayed a growth defect, a 25% decrease in mortality of *Galleria mellonella* larvae within 24 h, a reduction of about 50% in adhesion to epithelial cells, a decrease of about 35% in survival in whole blood, and increases of about 100% and 200% in phagocytosis by phagocytes at 10:1 and 50:1 infection ratios, respectively. [Conclusion] The glycosyl hydrolase GhA promotes the growth and participates in the pathogenic process of SS2 by promoting the adhesion, improving the survival in blood, and resisting phagocytosis.

**Keywords:** *Streptococcus suis*; pathogenicity; virulence gene; glycosyl hydrolase

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种重要的人畜共患病原菌,可引起猪的严重疾病,包括脑膜炎、心内膜炎和败血症等,也可感染人,导致链球菌(*Streptococcus* sp.)中毒性休克样综合征,甚至急性死亡<sup>[1-2]</sup>。在猪链球菌众多的血清型(至少 29 种)中,猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)是对猪和人致病性最强且流行性最广的血清型<sup>[3-4]</sup>。在全世界范围内,已报道的人感染猪链球菌病例达千余例。其中,中国

历经了 2 次大规模暴发,累计导致 55 人死亡,并且给养猪业带来极为沉重的经济打击,对公共卫生安全与畜牧业稳定构成双重挑战<sup>[2,5]</sup>。

几十年来,人们不断致力于 SS2 的致病性相关研究,相继发现了许多毒力因子(virulence factors, VF),包括猪链球菌溶血素(suilysin, Sly)<sup>[6-8]</sup>、荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)<sup>[9-10]</sup>和精氨酸酶系统(arginine deiminase system, ADS)<sup>[11-12]</sup>等。尽管如此,猪链球菌的致

病机制仍不清晰, 继续探究猪链球菌中新的毒力因子和毒力相关基因, 以进一步阐明其发病机制依旧十分必要。糖基水解酶是一类广泛存在于细菌中的酶, 它可以裂解糖苷、聚糖和糖缀合物中的糖苷键, 根据其功能和特性, 该酶的分类编码为 EC 3.2.1.-<sup>[13]</sup>。尽管糖基水解酶具有共同的折叠结构和活性位点拓扑, 但它们之间的序列相似性较低, 表现为底物多样性<sup>[13]</sup>。据报道, 该类酶除了糖基水解酶活性外, 也在细菌的致病性中发挥作用, 比如, 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 中糖基水解酶 CHIP 介导了肺炎链球菌毒力<sup>[14]</sup>。

基于前期 SS2 转座子插入突变体库的筛选结果, 发现了新的毒力相关基因 B9H01\_RS10315, 编码阿拉伯糖苷酶(arabinosidase), 属于糖基水解酶(glycosyl hydrolase)家族, 将其命名为 *ghA*<sup>[15-16]</sup>。基于此, 本研究拟构建 *ghA* 基因的缺失株  $\Delta ghA$  及其回补株  $C\Delta ghA$ , 并通过体内外致病试验进一步阐明其参与的致病过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

猪链球菌 SC19 菌株是 2005 年从我国四川省猪链球菌疫情暴发中所分离的血清 2 型强毒株<sup>[17]</sup>。大蜡螟幼虫, 中国成都川农虫业公司, 保存在 15 °C 的避光环境中。新鲜猪全血采自健康的仔猪。小鼠单核巨噬细胞 Raw264.7, 中国武汉普诺赛生命科技有限公司。人喉上皮细胞 Hep-2, 本实验室保存。

### 1.2 培养基

脑心浸液(brain-heart infusion, BHI)培养基, 碧迪医疗器械有限公司; DMEM 细胞培养基, 赛默飞世尔科技有限公司。

### 1.3 主要试剂和仪器

胎牛血清, 中国杭州四季青生物工程材料

有限公司; 细菌基因组提取试剂盒, Omega 公司; RNA 提取试剂盒, Promega 公司; PCR 试剂盒及逆转录试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 多肽, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 引物, 北京擎科生物科技股份有限公司; PBS 缓冲液, 江苏凯基生物技术股份有限公司。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 全自动酶标仪, Bio-Tek 公司; 光学显微镜, Nikon 公司。

### 1.4 缺失菌株和回补菌株的构建

基于同源重组原理利用多肽诱导法完成目的基因 *ghA* 缺失株和回补株的构建<sup>[18]</sup>。以细菌基因组提取试剂盒提取的 SC19 基因组为模板, 使用引物  $\Delta ghA$ -P1/ $\Delta ghA$ -P2 和  $\Delta ghA$ -P5/ $\Delta ghA$ -P6 (表 1) 分别扩增 *ghA* 基因(B9H01\_RS10315)的上游和下游大约 500–1 000 bp 的同源臂片段, 随后与引物  $\Delta ghA$ -P3/ $\Delta ghA$ -P4 (表 1) 扩增的筛选表达盒(spectinomycin-resistance gene and copper-induced yoeBVp, SCIY)融合, 加入终浓度为 0.25 mmol/L 的多肽(序列: GNWGTWVEE), 采用自然转化法导入 SS2 野生菌株 SC19, 使用 100  $\mu$ g/mL 的壮观霉素筛选中间菌株。随后, 使用引物  $\Delta ghA$ -P1/ $\Delta ghA$ -P7 和  $\Delta ghA$ -P8/ $\Delta ghA$ -P6 (表 1) 再次扩增 *ghA* 基因的上游和下游同源臂, 进行融合后加入终浓度为 0.25 mmol/L 的多肽, 自然转化进上述所得的中间菌株, 最终使用终浓度 0.5 mmol/L 铜离子富集筛选得到无痕缺失株, 并进行基因组 PCR 鉴定<sup>[18]</sup>。以 SC19 基因组为模板, 使用引物  $\Delta ghA$ -P1/ $\Delta ghA$ -P6 (表 1) 再次扩增目的基因 *ghA*, 并包含 *ghA* 基因上游和下游同源臂的片段, 加入终浓度为 0.25 mmol/L 的多肽, 采用自然转化法导入 *ghA* 缺失株, 使用引物 *ghA*out-F/*ghA*out-R 进行 PCR 筛选 *ghA* 回补株。PCR 反应体系: 2 $\times$ Phanta Max Master Mix 25  $\mu$ L, 上、下游引物(表 1) (10  $\mu$ mol/L) 各 2  $\mu$ L, DNA 模板(50 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L。PCR

反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 56 °C 15 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。

为进一步验证 *ghA* 基因缺失株和回补株, 使用 RNA 提取试剂盒按说明书提取每个菌株的 RNA, 并使用逆转录试剂盒按说明书进行 RNA 逆转录。基因组 DNA 去除体系: RNase-free ddH<sub>2</sub>O 10 μL, 4×gDNA wiper Mix 4 μL, RNA 模板 (500 ng/μL) 2 μL; 反应条件: 42 °C 2 min。逆转录体系: 5×HiScript III qRT SuperMix 4 μL, 基因组 DNA 去除反应液 16 μL; 反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。以逆转录得到的 cDNA 为模板, 分别使用引物 10310-F/10310-R、*ghA*-F/*ghA*-R 和 10320-F/10320-R (表 1) 进行逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 分析, 确定 *ghA* 及其上下游基因的表达情况。RT-PCR 反应体系: 2×Phanta Max Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, cDNA 模板 (50 ng/μL) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 56 °C 15 s, 72 °C 2 min, 30 个循环;

72 °C 5 min。

### 1.5 大蜡螟幼虫感染试验

采用大蜡螟幼虫感染模型探究 SS2 野生株、缺失株和回补株的体内致病能力<sup>[19]</sup>。将菌株 SC19、缺失株  $\Delta ghA$  和回补株  $C\Delta ghA$  培养至  $OD_{600}$  为 0.6 左右 (约  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL), 用生理盐水洗涤 2 次后调整菌液至  $7.5 \times 10^7$  CFU/mL 和  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL。选取体重在 0.4–0.5 g 和 0.5–0.6 g 之间的幼虫, 每组 8 只幼虫, 在左后腿注射 20 μL 细菌悬浮液, 菌量分别约为  $1.5 \times 10^6$  CFU 和  $3 \times 10^6$  CFU, 同时注射等量的生理盐水作为阴性对照。在感染后 12 h 和 24 h 对幼虫的存活率进行监测。

### 1.6 生长曲线的测定

为了探究 GhA 对细菌生长的影响, 进行了菌株生长曲线的测定, 所有菌株的生长曲线都通过测定 600 nm 的吸光值来确定。挑取不同菌株的单菌落在含 5% 胎牛血清的 BHI 培养基中 37 °C、160 r/min 培养过夜, 第 2 天将菌液转接

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Target gene
$\Delta ghA$ -P1	TTATCCCGAATATAGTGCCAGAG	Left arm of <i>ghA</i>
$\Delta ghA$ -P2	CATGTATTCACGAACTGAAAATGTGATAAAATAGTAACAAATTG	
$\Delta ghA$ -P3	TTTATCACATTTTCAGTTCGTGAATACATGTTATAATAAC	The SC19 cassette
$\Delta ghA$ -P4	TATCAGGAGATTATTTGTAAAATATAACGCCCAATT	
$\Delta ghA$ -P8	TTTATCACATTTTCAAATAATCTCCTGATACTTCAT	Right arm of <i>ghA</i>
$\Delta ghA$ -P7	TATCAGGAGATTATTTGAAAATGTGATAAAATAGTAACAAATTGT	Left arm of <i>ghA</i>
$\Delta ghA$ -P5	GCGTTATATTTTACAAATAATCTCCTGATACTTCAT	Right arm of <i>ghA</i>
$\Delta ghA$ -P6	ACTCGTTAAGTTGACAGGTAAGAA	
<i>ghA</i> out-F	ACCTCAACAGGTACTAAAGAAGG	A fragment containing <i>ghA</i>
<i>ghA</i> out-R	CTAGACCTGTTTGTCTAATCTTTG	
10310-R	TTAGTTAAAACCATAAATCTTTTCGCG	Upstream gene of <i>ghA</i>
10310-F	ATGGAGAGAAAGATGACCTTACT	
<i>ghA</i> -R	TCAGGAAAGTTGCTTTTGATATTTTC	The <i>ghA</i> gene of <i>S. suis</i>
<i>ghA</i> -F	ATGAAGTATCAGGAGATTATTAATCGT	
10320-R	TTATTTTCATGATTACAACTTCATCATTGG	Downstream gene of <i>ghA</i>
10320-F	ATGAAAGAATGGATTGCCAAAC	

到新鲜的含 5%胎牛血清的 BHI 培养基中培养到对数期  $OD_{600}=0.6$  左右(约  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL), 再次转接细菌到 8 mL 新鲜 5%胎牛血清的 BHI 培养基中。调整所有样品的初始  $OD_{600}$  均为 0.01, 每隔 1 h 进行 1 次  $OD_{600}$  测定。此外, 通过革兰氏染色观察细菌对数中期的形态。

### 1.7 黏附试验

采用人喉上皮细胞 Hep-2 感染模型探究 SS2 野生株、缺失株和回补株的黏附能力<sup>[20]</sup>。将菌株 SC19、缺失株  $\Delta ghA$  和回补株  $C\Delta ghA$  培养至  $OD_{600}$  为 0.6 左右(约  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL), 随后用 PBS 洗涤 2 次, 稀释于 DMEM 细胞培养基中, 按照感染复数(multiplicity of infection, MOI) (细菌:细胞)=10:1 感染 Hep-2 细胞。在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 2 h 后, 用 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入灭菌 ddH<sub>2</sub>O (冰浴预冷)裂解 30 min, 充分吹打混匀后进行细菌稀释涂板计数。

### 1.8 全血杀伤试验

采用猪全血探究 GhA 对细菌在血液中存活能力的影响<sup>[21]</sup>。分别取 100  $\mu$ L 培养至对数生长期  $OD_{600}=0.6$  左右(约  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL)的 SS2 野生株、缺失株和回补株(调整菌液浓度为  $5 \times 10^7$  CFU/mL)菌液添加到含有 900  $\mu$ L 新鲜猪全血的无菌 EP 管中, 37 °C 孵育, 分别于 0.5 h 和 2 h 后取 100  $\mu$ L 样品进行梯度稀释, 涂布在无抗性的含 5%灭活牛血清的 BHI 固体培养基上 37 °C 培养过夜, 进行活菌计数, 分别计算各菌株在全血中的存活率。存活率(%)=(孵育后 CFU/孵育前 CFU)×100。

### 1.9 抗吞噬试验

采用小鼠单核巨噬细胞 Raw264.7 感染模型探究 SS2 野生株、缺失株和回补株的抗吞噬能力<sup>[21]</sup>。将菌株 SC19、缺失株  $\Delta ghA$  和回补株  $C\Delta ghA$  培养至  $OD_{600}=0.6$  左右(约  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL), 随后用 PBS 连续洗涤 2 次, 稀释于 DMEM 细

胞培养基中,按照 MOI (细菌:细胞)=10:1 和 50:1 分别感染 Raw264.7 细胞。在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 2 h 后, PBS 洗涤 2 次, 每孔加入含终浓度为 100  $\mu$ g/mL Amp 的 DMEM 细胞培养基, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 作用 60 min 杀死胞外细菌后, PBS 洗涤 2 次, 每孔加入适量灭菌 ddH<sub>2</sub>O (冰浴预冷)裂解 30 min, 充分吹打混匀后进行细菌稀释涂板计数。

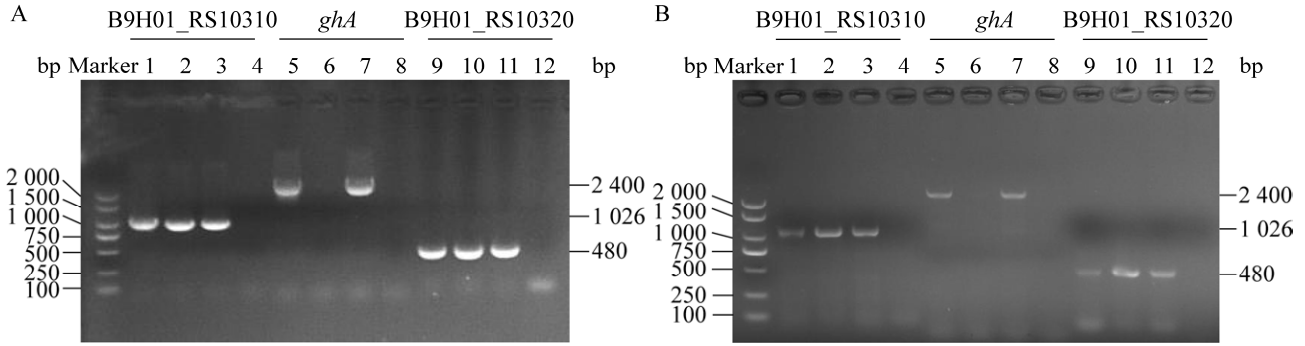
## 2 结果与分析

### 2.1 GhA 影响猪链球菌的大蜡螟幼虫致病性

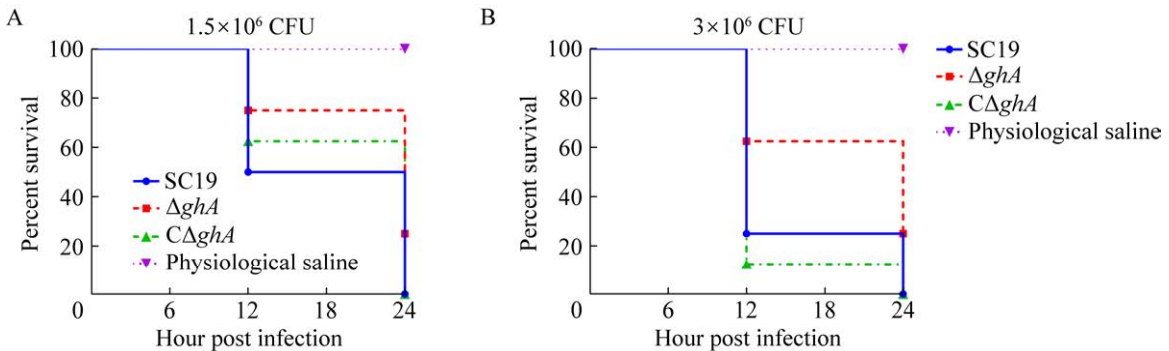
构建了  $ghA$  的缺失株  $\Delta ghA$  及其回补株  $C\Delta ghA$ , 并通过 PCR 进行了基因水平和转录水平的验证。在基因组水平上,  $ghA$  均完成了正确的敲除和回补, 并且未影响上下游基因(图 1A); 在转录水平上,  $ghA$  在缺失株中并未转录, 回补后转录正常, 并且  $ghA$  的敲除和回补均未影响其上下游基因的正常转录(图 1B)。随后, 通过进行菌株  $\Delta ghA$ 、 $C\Delta ghA$  和 SC19 的大蜡螟幼虫感染试验, 分析菌株  $\Delta ghA$ 、 $C\Delta ghA$  和 SC19 对大蜡螟幼虫的致死率发现, 2 组不同剂量的大蜡螟幼虫感染试验中缺失株  $\Delta ghA$  的存活曲线与野生株 SC19 和回补株  $C\Delta ghA$  相比无显著性差异。2 种剂量感染大蜡螟幼虫 12 h 后, 缺失株  $\Delta ghA$  的大蜡螟幼虫致死率均低于野生株和回补株, 但由于个体差异, 野生株和回补株在 12 h 的致死率并不完全一致; 2 种剂量感染大蜡螟幼虫 24 h 后, 野生株和回补株的致死率均为 100%, 相较于野生株和回补株, 缺失株  $\Delta ghA$  的大蜡螟幼虫的 24 h 致死率均下降 25%, 致病力同时下降(图 2)。

### 2.2 GhA 参与猪链球菌的生长

通过对菌株  $\Delta ghA$ 、 $C\Delta ghA$  和 SC19 的革兰氏染色观察,  $ghA$  缺失并未对猪链球菌的形态



**图 1** 缺失株和回补株的 PCR (A)和 RT-PCR (B)验证 A: 1-4: 引物 10310-F/10310-R 扩增的 *ghA* 上游基因; 5-8: 引物 *ghA*-F/*ghA*-R 扩增的 *ghA*; 9-12: 引物 10320-F/10320-R 扩增的 *ghA* 下游基因。1、5 和 9, 以野生株 SC19 的基因组 DNA 为 PCR 模板; 2、6 和 10, 以缺失株  $\Delta ghA$  的基因组 DNA 为 PCR 模板; 3、7、11, 以回补株  $C\Delta ghA$  的基因组 DNA 为模板; 4、8、12: 阴性对照。B: 使用相同的引物将基因组模板全部替换为相应菌株的 cDNA 为模板, 对菌株 SC19、 $\Delta ghA$ 、 $C\Delta ghA$  进行转录水平分析。Figure 1 PCR (A) and RT-PCR (B) verification of  $\Delta ghA$  and  $C\Delta ghA$ . A: 1-4: The amplification of the upstream gene of *ghA* using the primer pair 10310-F/10310-R. 5-8: The amplification of *ghA* using the primer pair *ghA*-F/*ghA*-R. 9-12: The amplification of the downstream gene of *ghA* using the primer pair 10320-F/10320-R. 1, 5, and 9: The genomic DNA of *S. suis* SC19 was used as the template for PCR; 2, 6, and 10: The genomic DNA of  $\Delta ghA$  was used as the template for PCR; 3, 7, and 11: The genomic DNA of  $C\Delta ghA$  was used as the template for PCR; 4, 8, and 12: The negative control. B: Same primers were used as above, and the cDNA of strain SC19,  $\Delta ghA$ , and  $C\Delta ghA$  were used as templates.



**图 2** 缺失株、回补株和野生株的大蜡螟幼虫感染试验 A: 低剂量  $1.5 \times 10^6$  CFU/只, 0.4-0.5 g/只; B: 高剂量  $3 \times 10^6$  CFU/只, 0.5-0.6 g/只。

Figure 2 *Galleria mellonella* larvae infection assays of  $\Delta ghA$ ,  $C\Delta ghA$ , and SC19 strains. A: Low dose  $1.5 \times 10^6$  CFU/larvae, 0.4-0.5 g/larvae; B: High dose  $3 \times 10^6$  CFU/larvae, 0.5-0.6 g/larvae.

造成影响。然而, 菌株生长曲线显示, 缺失株  $\Delta ghA$  在对数生长期的生长速度慢于野生株 SC19 和回补株  $C\Delta ghA$ , 并且平台期的菌液浓度显著低于野生株 SC19 和回补株  $C\Delta ghA$  (图 3)。

### 2.3 GhA 影响猪链球菌的上皮细胞黏附能力

分析菌株  $\Delta ghA$ 、 $C\Delta ghA$  和 SC19 对 Hep-2 细胞的黏附率发现,  $\Delta ghA$  突变体对 Hep-2 的黏

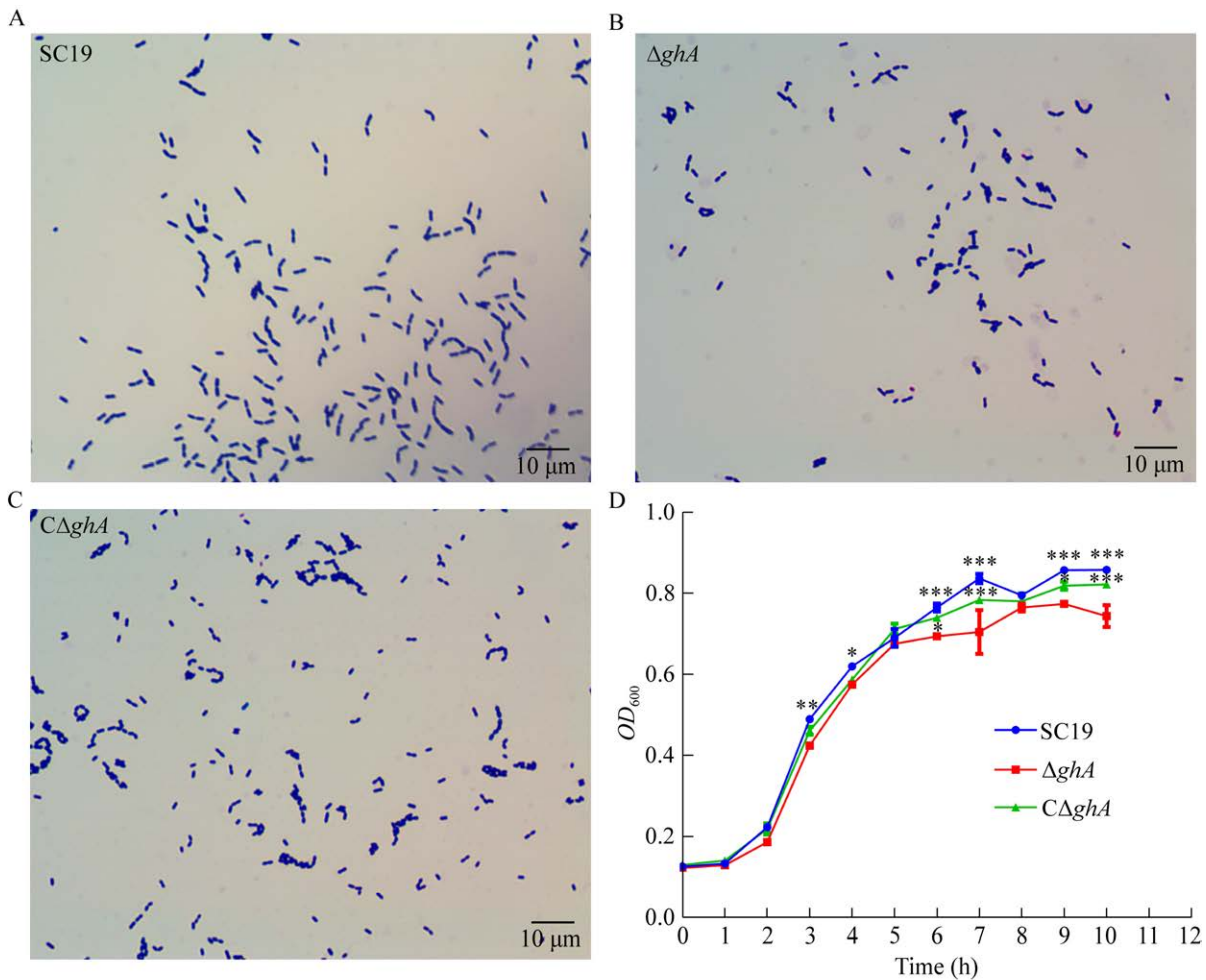


图 3 缺失株、回补株和野生株的生长形态观察 A: SC19 革兰氏染色形态学观察结果。B:  $\Delta ghA$  革兰氏染色形态学观察结果。C:  $C\Delta ghA$  革兰氏染色形态学观察结果。D: 菌株生长曲线。

Figure 3 Cell morphology and growth characterizations of  $\Delta ghA$ ,  $C\Delta ghA$ , and SC19 strains. A: Morphological analysis by Gram staining of SC19. B: Morphological analysis by Gram staining of  $\Delta ghA$ . C: Morphological analysis by Gram staining of  $C\Delta ghA$ . D: Growth curve. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

附率比 SC19 降低约 50% (图 4), 缺失株  $\Delta ghA$  黏附能力显著下降, 同时可见回补株  $C\Delta ghA$  的黏附能力相较于缺失株得到了一定的回补。

#### 2.4 GhA 影响猪链球菌的血液存活能力

使用缺失株  $\Delta ghA$ 、回补株  $C\Delta ghA$  和野生株 SC19 进行猪全血杀伤试验。如图 5A 所示, 孵育 0.5 h 后, 菌株 SC19 和  $C\Delta ghA$  在猪全血中分别增长了约 10% 和 30%, 相反,  $\Delta ghA$  下降了约

30%; 孵育 2 h 后, 菌株 SC19 和  $C\Delta ghA$  在猪全血中均增长了约 50%, 而  $\Delta ghA$  仅增长约 15% (图 5B)。尽管  $C\Delta ghA$  在 0.5 h 的存活率高于 SC19, 但两者整体趋势保持增长, 并且在 2 h 两者存活率差异消失, 相反  $\Delta ghA$  在 0.5 h 存活下降, 并且在 2 h 的增长速度显著低于回补株和野生株。综上, 缺失株  $\Delta ghA$  的血液存活能力显著降低, 回补  $ghA$  基因后, 血液存活能力得到了恢复。

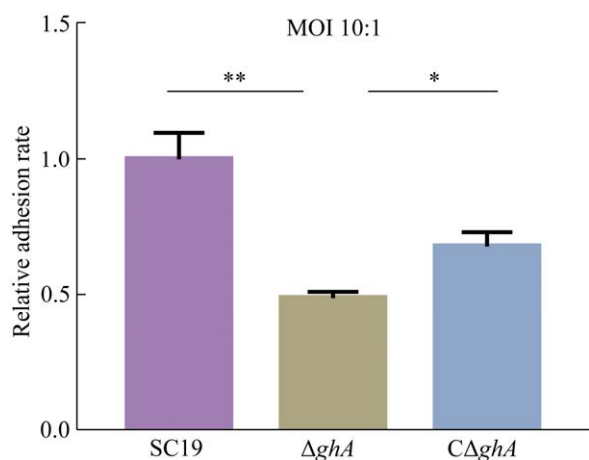


图4 缺失株、回补株和野生株的黏附能力测定  
Figure 4 Adhesion assay of  $\Delta ghA$ ,  $C\Delta ghA$ , and SC19 strains. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

## 2.5 GhA 影响猪链球菌的抗吞噬能力

通过小鼠巨噬细胞吞噬试验测定缺失株  $\Delta ghA$ 、回补株  $C\Delta ghA$  和野生株 SC19 的抗吞噬能力。如图 6 所示,在 MOI 为 10:1 时,缺失株  $\Delta ghA$  的吞噬率较野生株和回补株显著升高;在 MOI 为 50:1 时,缺失株  $\Delta ghA$  的吞噬率同样较野生株和回补株显著升高。综上,相较于野生株 SC19

和回补株  $C\Delta ghA$ , 缺失株  $\Delta ghA$  对 Raw264.7 巨噬细胞更为敏感, 更容易被吞噬。

## 3 讨论

猪链球菌是一种重要的人畜共患病原菌, 已经成为全球养猪业重大经济损失的主要原因<sup>[22]</sup>。作为一种共生菌, 在大多数猪场中, 它在新生仔猪的上呼吸道中占比较高, 毒株可进入血液并引起全身性感染, 并且可以通过直接接触传播给人类, 引发败血症和脑膜炎, 导致极高的死亡率<sup>[4]</sup>。SS2 的毒力因子协助菌体抵抗黏膜免疫的防御, 黏附并侵入黏膜上皮细胞, 在血液中存活, 导致严重的全身性疾病<sup>[23-24]</sup>。因此, 继续寻找新的毒力因子或毒力相关基因对于进一步解析 SS2 的致病机制至关重要。

基于序列相似性和结构的预测, 糖基水解酶在碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZy)数据库中被划分为 113 个家族, 基因 *ghA* 编码一种阿拉伯糖苷酶, 但其在猪链球菌中的功能尚不清楚。在前期的研究中, 通

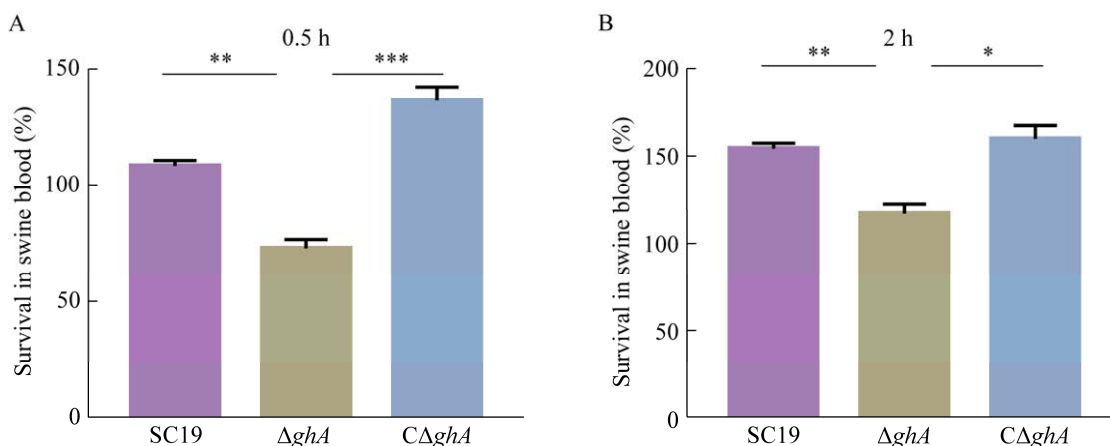


图5 缺失株、回补株和野生株的血液存活能力测定 A: SS2 菌株在猪全血中 0.5 h 的存活结果; B: SS2 菌株在猪全血中 2 h 的存活结果。

Figure 5 Whole blood killing assay of  $\Delta ghA$ ,  $C\Delta ghA$ , and SC19 strains. A: The survival results of SS2 strains in swine blood for 0.5 h; B: The survival results of SS2 strains in swine blood for 2 h. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .



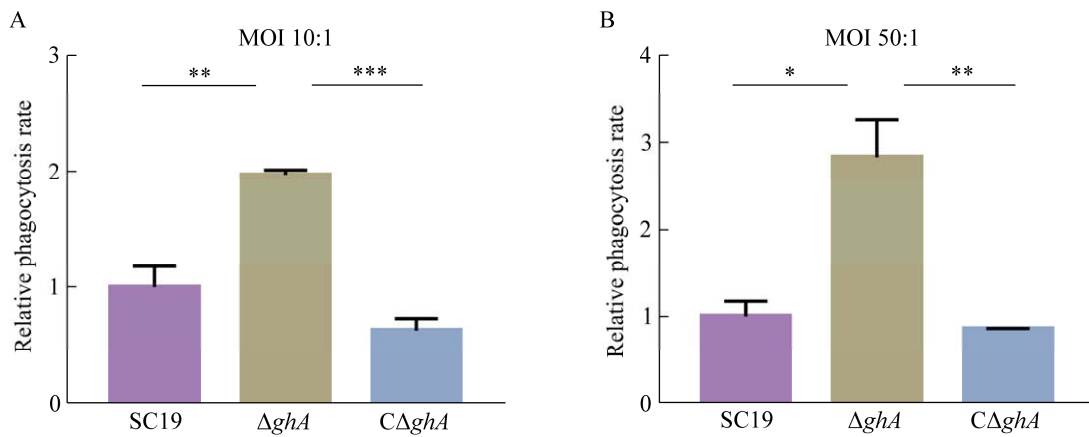


图 6 缺失株、回补株和野生株的抗吞噬能力测定 A: 10 倍感染比下的菌株吞噬试验结果; B: 50 倍感染比下的菌株吞噬试验结果。

Figure 6 Macrophage phagocytosis assay of  $\Delta ghA$ , C $\Delta ghA$ , and SC19 strains. A: Results of macrophage phagocytosis assay of SS2 strains at 10:1 infection ratio; B: Results of macrophage phagocytosis assay of SS2 strains at 50:1 infection ratio. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

过大蜡螟幼虫感染模型筛选 Tn917 转座插入突变体库发现, *ghA* 插入突变体的大蜡螟幼虫致死率降低<sup>[15]</sup>。为了进一步验证 GhA 影响猪链球菌的致病力, 本研究构建了 *ghA* 的缺失株及其回补株。缺失株  $\Delta ghA$ 、回补株 C $\Delta ghA$  和野生株 SC19 的大蜡螟幼虫感染试验也进一步证实了 GhA 在猪链球菌的发病机制中起重要作用。革兰氏染色观察显示, *ghA* 的缺失并不影响菌株形态, 但生长曲线显示  $\Delta ghA$  在对数生长后期的生长速度明显慢于 SC19, 表明 GhA 参与猪链球菌的生长。GhA 具有调节猪链球菌生长的作用, 而细菌生长是最重要的生理过程之一,  $\Delta ghA$  毒力减弱的一个可能解释是它对猪链球菌复制和生长的影响<sup>[25-26]</sup>。随后, 为了进一步探究 GhA 参与的细菌致病过程, 本研究进行了一系列的体外致病试验。结果表明, 相较于野生株和回补株, 缺失株  $\Delta ghA$  对气管上皮细胞 Hep-2 的黏附能力显著下降, 在全血中存活能力显著降低, 对吞噬细胞的敏感性显著增强, 进一步证

实了 GhA 在猪链球菌毒力中的作用。

糖基水解酶是一种广泛存在于细菌间的酶家族, 它们通过催化糖基水解反应, 将复杂的多聚糖分子分解成较小的单糖分子, 参与代谢调节和信号传导等生理过程, 甚至影响病原微生物的致病性<sup>[27-28]</sup>。已有研究报道, 在肺炎链球菌中一个 G25 家族的糖基水解酶 CHIP, 介导肺炎链球菌对宿主细胞的入侵, 并通过 TLR2 和 JNK/p38MAPK 引发强烈的先天免疫应答介导致病性<sup>[13-14]</sup>。在本研究中, 我们发现 *ghA* 的缺失不仅影响了猪链球菌的体内致病力, 还影响了猪链球菌对上皮细胞的黏附能力、抗巨噬细胞吞噬能力及全血中的存活能力。黏附和入侵宿主细胞是病原菌感染宿主的关键步骤, 细菌存活和逃逸宿主先天免疫反应也是细菌感染期间的重要过程<sup>[20,29]</sup>。因此, GhA 的致病机制值得进一步探究。此外, GhA 作为一个糖基水解酶, 确定其底物对于揭示 GhA 介导猪链球菌致病性的潜在机制也至关重要。

## 4 结论

本研究验证了一个新的 SS2 毒力相关基因 *ghA*, 并通过一系列的体内体外试验研究了 GhA 的生物学特性, 初步确定了其参与的致病过程, 为探索猪链球菌的发病机制提供了有价值的信息。

## REFERENCES

- [1] DOU BB, YANG X, YANG FM, YAN K, PENG W, TANG J, PENG MZ, HE QY, CHEN HC, YUAN FY, BEI WC. The *VraSR* two-component signal transduction system contributes to the damage of blood-brain barrier during *Streptococcus suis* meningitis[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 172: 105766.
- [2] LUN ZR, WANG QP, CHEN XG, LI AX, ZHU XQ. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2007, 7(3): 201-209.
- [3] LACOUTURE S, OKURA M, TAKAMATSU D, CORSAUT L, GOTTSCHALK M. Development of a mismatch amplification mutation assay to correctly serotype isolates of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, 1/2, and 14[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2020, 32(3): 490-494.
- [4] 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(6): e45.
- [5] 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.
- [6] LIN L, XU L, LV WH, HAN L, XIANG YZ, FU L, JIN ML, ZHOU R, CHEN HC, ZHANG AD. An NLRP3 inflammasome-triggered cytokine storm contributes to streptococcal toxic shock-like syndrome (STSLs)[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(6): e1007795.
- [7] JIANG CS, ZHOU P, ZHANG XQ, MA NN, HU YF, ZHANG MJ, GHONAIM AH, LI HM, DONG L, ZENG W, LI C, LANG YF, SUN YM, HE QG, LI WT. ARF6 promotes *Streptococcus suis* *suilysin* induced apoptosis in HBMECs[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 268: 131839.
- [8] LUN SC, PEREZ-CASAL J, CONNOR W, WILLSON PJ. Role of *suilysin* in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2003, 34(1): 27-37.
- [9] TANG JS, GUO MR, CHEN M, XU B, RAN TT, WANG WW, MA Z, LIN HX, FAN HJ. A link between STK signalling and capsular polysaccharide synthesis in *Streptococcus suis*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2480.
- [10] SMITH HE, DAMMAN M, van der VELDE J, WAGENAAR F, WISSELINK HJ, STOCKHOFF-ZURWIENEN N, SMITS MA. 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.
- [11] FULDE M, WILLENBORG J, HUBER C, HITZMANN A, WILLMS D, SEITZ M, EISENREICH W, VALENTIN-WEIGAND P, GOETHE R. The arginine-ornithine antiporter *ArcD* contributes to biological fitness of *Streptococcus suis*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4: 107.
- [12] CHAKRABORTY B, BURNE RA. Effects of arginine on *Streptococcus mutans* growth, virulence gene expression, and stress tolerance[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(15): e00496-17.
- [13] NIU SQ, LUO M, TANG J, ZHOU H, ZHANG YL, MIN X, CAI XF, ZHANG WL, XU WC, LI DF, DING JJ, HU YL, WANG DC, HUANG AL, YIN YB, WANG DQ. Structural basis of the novel *S. pneumoniae* virulence factor, GHIP, a glycosyl hydrolase 25 participating in host-cell invasion[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68647.
- [14] DONG J, WANG J, HE YJ, LI CW, ZHOU AE, CUI J, XU WC, ZHONG L, YIN YB, ZHANG XM, WANG H. GHIP in *Streptococcus pneumoniae* is involved in antibacterial resistance and elicits a strong innate immune response through TLR2 and JNK/p38MAPK[J]. *FEBS Journal*, 2014, 281(17): 3803-3815.
- [15] FAN JY, ZHAO LL, HU Q, LI SQ, LI HT, ZHANG QQ, ZOU G, ZHANG LS, LI L, HUANG Q, ZHOU R. Screening for virulence-related genes *via* a transposon mutant library of *Streptococcus suis* serotype 2 using a *Galleria mellonella* larvae infection model[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(5): 868.
- [16] SHIN HY, PARK SY, SUNG JH, KIM DH. Purification and characterization of alpha-L-arabinopyranosidase and alpha-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium metabolizing ginsenoside Rb2 and Rc[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 7116-7123.
- [17] LI W, LIU L, CHEN HC, ZHOU R. Identification of *Streptococcus suis* genes preferentially expressed under iron starvation by selective capture of transcribed sequences[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 292(1): 123-133.
- [18] ZHENG CK, WEI M, QIU J, LI JQ. A markerless gene deletion system in *Streptococcus suis* by using the copper-inducible *Vibrio parahaemolyticus* YoeB toxin as a counterselectable marker[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 1095.
- [19] VELIKOVA N, KAVANAGH K, WELLS JM. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for studying the virulence of *Streptococcus suis*[J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 291.
- [20] MENG Y, WANG Q, MA Z, LI WY, NIU K, ZHU T, LIN HX, LU CP, FAN HJ. Streptococcal autolysin promotes dysfunction of swine tracheal epithelium by interacting with vimentin[J]. *PLoS Pathogens*, 2022, 18(8): e1010765.
- [21] XU JJ, CHEN L, PANG SQ, ZHANG QH, DENG SM, ZHU JQ, CHEN XB, LANGFORD PR, HUANG Q,

- ZHOU R, LI L. HylS', a fragment of truncated hyaluronidase of *Streptococcus suis*, contributes to immune evasion by interaction with host complement factor C3b[J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2306691.
- [22] URUÉN C, FERNANDEZ A, ARNAL JL, del POZO M, AMORIBIETA MC, de BLAS I, JURADO P, CALVO JH, GOTTSCHALK M, GONZÁLEZ-VÁZQUEZ LD, ARENAS M, MARÍN CM, ARENAS J. Genomic and phenotypic analysis of invasive *Streptococcus suis* isolated in Spain reveals genetic diversification and associated virulence traits[J]. *Veterinary Research*, 2024, 55(1): 11.
- [23] SEGURA M, CALZAS C, GRENIER D, GOTTSCHALK M. Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses[J]. *FEBS Letters*, 2016, 590(21): 3772-3799.
- [24] 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.
- [25] EGAN AJF, ERRINGTON J, VOLLMER W. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(8): 446-460.
- [26] ZHANG CY, SUN W, TAN MF, DONG MM, LIU WQ, GAO T, LI L, XU ZF, ZHOU R. The eukaryote-like serine/threonine kinase STK regulates the growth and metabolism of zoonotic *Streptococcus suis*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 66.
- [27] LI MH, XIE LF, WANG M, LIN YL, ZHONG JQ, ZHANG Y, ZENG J, KONG GH, XI PG, LI HP, MA LJ, JIANG ZD. Correction: FoQDE2-dependent miRNA promotes *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* virulence by silencing a glycosyl hydrolase coding gene expression[J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19(3): e1011292.
- [28] LIU XF, ZHAO HH, XIE JT, FU YP, LI B, YU X, CHEN T, LIN Y, JIANG DH, CHENG JS. A glycosyl hydrolase 5 family protein is essential for virulence of necrotrophic fungi and can suppress plant immunity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(5): 2693.
- [29] PEI XM, LIU MX, ZHOU H, FAN HJ. Screening for phagocytosis resistance-related genes via a transposon mutant library of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Virulence*, 2020, 11(1): 825-838.