

高致病性 2 型猪链球菌毒素-抗毒素系统 SezAT 的鉴定与活性研究

王敏 李明 钟秋 赵岩 饶贤才 黎庶 谭银玲 胡福泉*

(第三军医大学 基础医学部微生物学教研室 重庆 400038)

摘要:【目的】对我国高致病性 2 型猪链球菌 05ZYH33 基因组的 89K 毒力岛序列进行生物信息学分析,发现存在一对与化脓链球菌 Epsilon-zeta (ϵ - ζ)同源的 II 型毒素-抗毒素系统(Toxin-antitoxin system, TA)——SezAT,推测该系统具有稳定 89K 毒力岛使其不易丢失的作用。验证 SezAT 为有活性的 TA 系统。【方法】对 SezAT 进行了生物信息学分析;RT-PCR 验证 SezAT 共转录特性;在大肠杆菌中选择性地诱导表达毒素蛋白 SezT 和抗毒素蛋白 SezA;最后通过同源重组技术敲除 SezAT 系统。【结果】sezAT 由同一操纵子控制,SezT 可抑制细菌生长,SezA 可中和 SezT 的毒性作用,同源重组成功获得 sezT 敲除突变株。【结论】证实 SezAT 为一对有活性的毒素-抗毒素(TA)系统,为进一步研究 SezAT 可能发挥稳定 89K 毒力岛的功能,同时获得 89K 毒力岛缺失突变株并深入认识 89K 在我国高致病性 SS2 中的作用奠定了基础。

关键词: 毒素-抗毒素系统, 2 型猪链球菌, 高致病性, 毒力岛, 敲除

Identification and activity assay of the SezAT toxin-antitoxin system of highly pathogenic *Streptococcus suis* serotype 2

WANG Min LI Ming ZHONG Qiu ZHAO Yan RAO Xian-Cai
LI Shu TAN Yin-Ling HU Fu-Quan*

(Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: [Objective] Bioinformatics analysis revealed that the 89K pathogenicity island

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30971574); 全军医学科技“十二五”科研面上项目(No. CWS11J135)

*通讯作者: Tel: 86-23-68752834; 邮箱: hoofuquan@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-11-11; 接受日期: 2011-12-08

(PAI) of highly pathogenic *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) in China encodes a putative type II toxin-antitoxin (TA) system named SezAT, which is homologous to the epsilon-zeta system from *S. pyogenes*. SezAT is presumed to be requisite for the stability of the 89K PAI in SS2. To confirm the SezAT system is a functional TA system. [Methods] The sequence characteristics of SezAT were subjected to further bioinformatics analysis. RT-PCR was performed to analyze the transcriptions of the *sezAT* locus and the flanking genes. The SezT toxin and SezA antitoxin proteins were selectively overexpressed in *Escherichia coli*. Deletion mutagenesis was carried out to obtain a SezAT-deficient mutant. [Results] Bioinformatics analysis and RT-PCR results suggest that *sezAT* are in the same operon. Overexpression of SezT led to severe growth inhibition of the host bacteria, while this toxicity was counteracted by the expression of SezA. Finally, the toxin-encoding gene *sezT* was successfully knockout by allelic replacement. [Conclusion] All of these results suggest that SezAT is an activated toxin-antitoxin (TA) system. Moreover, our results provide foundations for investigating the potential stabilized effect of SezAT in the 89K PAI, and screening an 89K-negative mutant to better understand the pathopoiesis of 89 K in highly pathogenic SS2.

Keywords: Toxin-antitoxin system, *Streptococcus suis* serotype 2, Highly pathogenic, Pathogenicity island, Knockout

2 型猪链球菌(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)是一种重要的人畜共患传染病病原菌, 1998 年和 2005 年我国江苏和四川两省分别爆发的大规模 SS2 感染猪和人的公共卫生事件, 引发临床上罕见的链球菌中毒性休克综合征(*Streptococcal toxic shock syndrome*, STSS), 致死率高达 62.7%–81.3%, 引起国内外高度关注^[1]。为了对造成这两次重大公共卫生事件的 SS2 流行菌株的高致病性进行深入研究, 本课题组前期通过全基因组测序和比较基因组学分析发现这两次 SS2 流行菌株均携带有一个独特的 89K 毒力岛, 为揭示我国 SS2 高致病性尤其是引发 STSS 的分子机制开辟了方向^[2]。我们进一步研究发现, 高致病性 SS2 上的 89K 毒力岛可以极小频率从细菌染色体上天然切离下来, 并形成环化分子, 进而通过 89K 内部编码的 IV 型分泌系统(Type IV secretion system, T4SS)发生基因水平转移, 使不具备 89K 毒力岛的菌株获得该毒力遗传物质, 这对于高致病性 SS2 菌株的形成与传播有着非常重要的流行

病学意义^[3]。为了从整体水平研究 89K 毒力岛的致病作用, 我们用各种诱导方法(高温、丝裂霉素 C、亚硝基胍 MNNG、电转化等)试图获得一株 89K 毒力岛缺失的 SS2 突变株, 遗憾的是始终未能成功。

进一步的生物信息学分析发现, 89K 毒力岛序列中编码着一个与 Epsilon-zeta (ϵ - ζ)同源的 II 型毒素-抗毒素(Toxin-antitoxin, TA)系统, 我们将其命名为 SezAT (*Streptococcus suis* epsilon zeta)。但任何生物信息学分析的结果都只能是提示, 该 TA 系统是否具有生物学功能, 尚需实验验证才能从功能上确证。

TA 系统由两个共转录的基因组成, 依据抗毒素蛋白的性质分为 I 型(本质上是一种 siRNA)和 II 型(蛋白质)^[4]。II 型 TA 系统两基因分别编码稳定的毒素蛋白和不稳定的抗毒素蛋白, 毒素和抗毒素蛋白形成复合体使毒素蛋白对细胞的毒性作用被抑制^[5]。最近的研究表明, 许多大型整合子(Superintegron)结构中都存在 TA 系统位点。

这些位点被认为是能够稳定大型整合子的结构, 从而限制大型整合子及其所携带基因大规模丢失^[6]。基于此, 我们提出设想, 毒力岛既然也属于大型整合子家族, 是否正是因为 SezAT 能够稳定 89K 毒力岛防止其丢失, 从而导致我们难以获得 89K 毒力岛缺失的突变株呢? 为此, 本文旨在对 89K 毒力岛上 SezAT 系统的生物学活性进行鉴定, 并通过同源重组技术敲除毒素编码基因 *sezT*, 为下一步以 $\Delta sezT$ 突变株为出发点, 获取 89K 毒力岛缺失突变株, 进一步研究 89K 在 SS2 高致病性中的作用奠定基础。再者, 89K 毒力岛缺失突变株也有发展成为新的疫苗候选株的前景。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

本实验所用的菌株和质粒见表 1, SS2 在 Todd-Hewitt broth (THB) (Difco Laboratories,

Detroit, MI) 并添加 2% 酵母提取物的培养基 (THY) 中培养, 大肠杆菌均用 LB 培养基培养。必要时添加抗生素 (Sigma), 各抗生素的工作浓度为: 氨苄青霉素 100 mg/L, 卡那霉素 50 mg/L, 壮观霉素 100 mg/L, 四环素 10 mg/L。

1.2 细菌总 RNA 提取和 RT-PCR

挑取 SS2 05ZYH33 单菌落于 THY 中 37 °C 摇过夜, 次日将过夜菌按 1:100 比例接种至新鲜 THY 中培养至对数生长期后期 ($OD_{600} \approx 0.8$), 取 1 mL 菌液用 SV 总 RNA 提取试剂盒 (Promega) 抽提细菌总 RNA, 用逆转录试剂盒 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 逆转录生成 cDNA 用于 RT-PCR。为检测 *sezAT* 及相邻基因的共转录情况, 分别以 05ZYH33 基因组 DNA 和 cDNA 为模板, 用扩增各基因间区域的特异引物 P1/P2、P3/P4、P5/P6、P7/P8 和 P9/P10 (各引物序列见表 2) 进行 PCR, 反应结束后取 5 μ L 扩增产物电泳观察结果。

表 1 本实验所用菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株/质粒 Strains/Plasmids	特征 Characteristics	来源 Source/reference
SS2 05ZYH33	2005 年资阳流行毒株, 分离自 STSS 病人	本室保存
SS2 $\Delta sezT$	<i>sezT</i> 基因敲除突变株, Spc^R	本文构建
<i>E. coli</i> JM109	重组质粒克隆宿主菌	本室保存
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	重组质粒表达宿主菌	本室保存
pUC18	克隆载体, Amp^R	本室保存
pMD19-T	T 载体, Amp^R	TaKaRa
pSET4s	猪链球菌温敏型自杀质粒, Spc^R	[7]
pJS298	含 PBAD 和 Plac 双启动子的表达质粒, Kan^R	[8]
pMD- <i>sezA</i>	克隆 <i>sezA</i> 抗毒素基因的重组 T 载体, Amp^R	本文构建
pMD- <i>sezT</i>	克隆 <i>sezT</i> 毒素基因的重组 T 载体, Amp^R	本文构建
pJS-A	克隆 <i>sezA</i> 抗毒素基因的重组 pJS298 载体, Kan^R	本文构建
pJS-AT	克隆 <i>sezA</i> 抗毒素基因和 <i>sezT</i> 毒素基因的重组 pJS298 载体, Kan^R	本文构建
pUC:: <i>sezT</i>	<i>sezT</i> 毒素基因敲除载体, Amp^R , Spc^R	本文构建
pUC:: <i>sezAT</i>	<i>sezAT</i> 系统基因敲除载体, Amp^R , Spc^R	本文构建

表 2 PCR 引物及序列
Table 2 Nucleotide sequence of gene-specific primers used for PCR

序号 Numbers	引物名称 Primers	序列(5'→3') Sequences of primers (5'→3')	酶切位点 Restriction sites
1	P1	ACCACAATATCATCTGCTCTTT	
2	P2	TTTCCAACTTTCAACATACAA	
3	P3	TTCTAAAGCAGCATCCTCTAAT	
4	P4	TTTTCTTTTCTGCACCACTTGA	
5	P5	TCGAAAAATGATGGAATGG	
6	P6	TCTTTGGGCAATGGAGTAA	
7	P7	TGTCCTCCAAGTAAGATAGC	
8	P8	GATAAAAGAACGTGGAGCAG	
9	P9	CTGGCTGTGTTAAATCGTGT	
10	P10	AAGAAAACCCAGAATCAGGA	
11	SezA-F	GAGACATATGATGAAAGCAAATATGAGGAG	<i>Nde</i> I
12	SezA-R	GAGAGGTACCAGCCACCACCCGATGATGCA	<i>Kpn</i> I
13	SezT-F	GAGAGAGCTCAATGAGGTTGGAAGAATTTA	<i>Sac</i> I
14	SezT-R	GAGAGAAATTCTTAATTTTCATTTCTTCTCTCCA	<i>EcoR</i> I
15	LA-F	GAAATTCTTCTCTGGGTCAATTCTTTTTACA	<i>EcoR</i> I
16	LA-R	GGATCCAACGGTTGGGGGAATTAGTCTCAG	<i>BamH</i> I
17	TRA-F	CTGCAGAGCCTCACTAAATTCTTCCAACCT	<i>Pst</i> I
18	TRA-R	AAGCTTTGTACAAACGCTCGCATCAAC	<i>Hind</i> III
19	TARA-F	CTGCAGTCATAGATAAAGACCTCCTC	<i>Pst</i> I
20	TARA-R	AAGCTTCATTAAGAATCATCCTCCAC	<i>Hind</i> III
21	Spc-F	GCAGGATCCGTTTCGTGAATACATGTTATA	<i>BamH</i> I
22	Spc-R	GGCTGCAGGTTTTCTAAAATCTGAT	<i>Pst</i> I
23	T-F	CAAGGTGCTGAGATAGGACAAT	
24	T-R	AAGCGGAGCCGTAAGACAAC	
25	OUT-F	GTACTACTAACTTCGAAAAATA	
26	OUT-R	TTCAGGCAATACAAGAGACG	

1.3 重组质粒 pJS-AT 的构建

为证实 89K 毒力岛上的 05SSU0936-0937 编码基因构成 *sezAT*, 我们将毒素编码基因 *sezT* 和抗毒素编码基因 *sezA* 分别克隆在 pJS298 质粒的阿拉伯糖启动子(PBAD)和乳糖启动子(Plac)下游^[8]。首先以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 用引物 SezA-F 和 SezA-R 扩增抗毒素编码基因 *sezA*, 连接至 pMD19-T 载体, 转化 JM109 感受态细菌, 挑取菌落鉴定阳性克隆, 命名为 pMD-*sezA*。将质粒

pJS298 和 pMD-*sezA* 分别进行 *Kpn* I 和 *Nde* I 双酶切, 回收载体和目的片段并进行连接, 构建重组质粒 pJS-A。然后再用引物 SezT-F 和 SezT-R 扩增毒素编码基因 *sezT*, 与 pMD19-T 载体连接构建重组质粒 pMD-*sezT*。pMD-*sezT* 质粒经 *Sac* I 和 *EcoR* I 双酶切后回收目的片段, 与经同样双酶切的 pJS-A 载体进行连接, 构建同时含有 *sezT* 和 *sezA* 的重组质粒 pJS-AT, 送测序以验证其序列的正确性。在重组质粒 pJS-AT 中, Plac 可被 IPTG

诱导并调控 SezA 抗毒素的表达, 而 PBAD 可被阿拉伯糖诱导并调控 SezT 毒素的表达。

1.4 SezAT 的活性测定

将重组质粒 pJS-A 和 pJS-AT 分别转化 BL21, 同时转化 pJS298 空质粒做对照。将含有各质粒的重组菌接种于含卡那霉素的液体 LB 中 37 °C 夜培养, 次日按 1:50 的比例接种至 4 管新鲜含卡那霉素的 LB 培养基中, 于 37 °C 培养至 OD_{600} 约 0.4。分别加入诱导剂 IPTG (终浓度为 1 mmol/L) 或阿拉伯糖(0.2%), 于加入诱导剂后 0.5、1、2、3、4、5、6 h 分别取样测定 OD_{600} 值, 同时每个时间点取菌液以 10^{-3} 比例稀释涂布卡那霉素平板, 次日进行活菌计数。

1.5 sezT 和 sezAT 敲除突变株的构建

为去除 89K 毒力岛中可能起稳定作用的 SezAT, 从而获得 89K 毒力岛缺失突变株, 拟通过同源重组的方法用壮观霉素抗性基因盒 (Spc^R) 替换毒素编码基因 *sezT* 或整个 *sezAT* 系统编码基因。以敲除 *sezT* 为例说明构建过程。首先, 以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 用引物 LA-UP/LA-D 和 TRA-UP/TRA-D 分别扩增 *sezT* 上下游同源臂, 并将得到的下游同源臂 LA 和上游同源臂 TRA 依次克隆到 pUC18 载体的多克隆位点(*EcoR* I /*Bam*H I 和 *Pst* I /*Hind* III)上。然后将扩增得到的 Spc^R 基因(模板为 pSET4s 质粒)克隆到已构建好 *sezT* 上下游同源臂的 pUC18 载体的 *Bam*H I /*Pst* I 多克隆位点上, 即为构建好的敲除质粒 pUC::*sezT*。构建针对整个 SezAT 的敲除质粒 pUC::*sezAT* 方法相似, 区别是将 pUC::*sezT* 的上游同源臂 TRA 换成针对 *sezAT* 系统的同源臂 TARA (由引物 TARA-UP/TARA-D 扩增)。最后将构建好的两个敲除质粒分别电转化 05ZYH33 感受态细胞, 并涂布于含壮观霉素的 THY 平板。挑取所有壮观霉素抗性的转化子用 *sezT* 内部检测引物 T-UP/D 进行 PCR 初筛, 可

疑突变株用多重 PCR 进一步交叉验证, 最后将 PCR 产物克隆 T 载体送测序, 以证实目的基因已被 Spc^R 替换掉。

2 结果

2.1 序列分析

用 RASTA-Bacteria (<http://genoweb.univ-rennes1.fr/duals/RASTA-Bacteria>) 在线工具^[9]预测 05ZYH33 基因组, 发现有 3 对 TA 系统存在, 均位于 89K 毒力岛外且同属于 RelBE 家族, 其毒素蛋白主要通过抑制蛋白质合成发挥作用^[10]。进一步分析发现 89K 毒力岛负链上的 05SSU0936 基因 (*sezT*) 编码产物与化脓链球菌 pSM19035 质粒上的 Zeta 毒素在氨基酸水平上有 44% 一致性。该基因与其上游的 05SSU0937 基因(*sezA*)有 1 个碱基对的重叠, 即 *sezA* 的终止密码子 TAA 的最后一个碱基 A 是 *sezT* 起始密码子 ATG 的第一个 A, 提示这两基因可能位于同一操纵子中。这种基因排列特点与两株肺炎链球菌(TIGR4 和 D39)的 TA 系统(SP_1050-SP_1051, GenBank: NC_003028 和 SPD_0930-SPD_0931, GenBank: CP000410)排列相似。

SezT 由 258 个氨基酸组成, 分子量为 29.3 kD, 是含 ATP 水解酶的 P-loop NTPase (又称 Walker A motif) 超家族, 研究发现 Zeta 毒素的 Walker A motif 是发挥毒性作用的关键结构域^[5]。SezA 为 168 个氨基酸, 分子量为 19.5 kD, 属 HTH-XRE 超家族, 为一类转录调节蛋白家族。进一步用 BLASTP 比对发现 SezA 和 SezT 均有大量同源蛋白存在, 其中与 PezAT (由 SP_1050-SP_1051 构成) 同源性高。PezAT 是肺炎链球菌 TIGR4 上一对 II 型 TA 系统, 已被证实是一对有活性的 TA 系统, 且 PezAT 位于 27 kb 大小的毒力岛上, 但 PezAT 对该毒力岛的稳定作用尚未见报道^[5]。同源性蛋白比对如图 1 所示, SezA

与 *PezA* (SP_1050)有 81%的一致性,相似性达到 93%; *SezT* 与 *PezT* 有 69%的一致性,相似性为 86%。近期研究发现 *Zeta* 毒素和 *PezT* 通过磷酸化细胞壁前体物质 UNAG 形成 UNAG-3P, 抑制肽聚糖合成从而发挥毒性作用^[11]。这些结果揭示 89 K 毒力岛上的 *SezAT* 可能与 *PezAT* 一样, 属同一家族的 TA 系统, *SezT* 为毒素蛋白, 而 *SezA* 作为抗毒素蛋白可拮抗 *SezT* 毒素蛋白的作用。

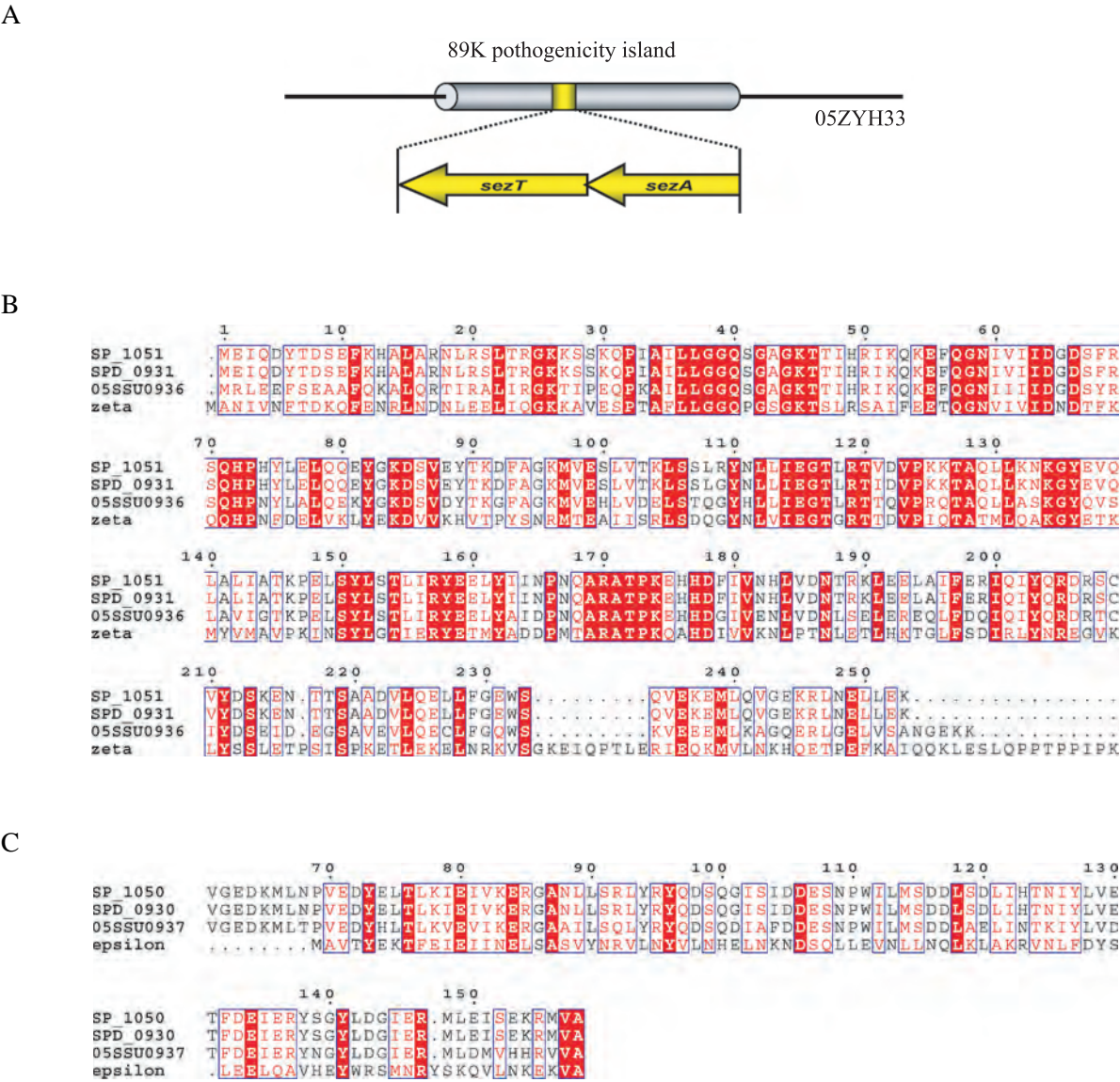


图 1 *SezAT* 的生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatical analysis of *SezAT*

注: A: *sezAT* 在 05ZYH33 基因组上的定位示意图(非比例); B: 毒素蛋白 *SezT* 的氨基酸比对; C: 抗毒素蛋白 *SezA* 的氨基酸比对, 序列分别来源于肺炎链球菌 TIGR4 (SP_1050-SP_1051)、D39 (SPD_0930-SPD_0931)、SS2 05ZYH33 (05SSU0937-05SSU0936)和化脓性链球菌的质粒 pSM19035 (*Epsilon-zeta*)。

Note: A: Genetic location of the *sezAT* locus in the chromosome of 05ZYH33 (not drawn to scale). B: Amino acid sequence alignment of *SezT*. C: Amino acid sequence alignment of *SezA*. The sequences are from *S. pneumoniae* TIGR4 (SP_1050-SP_1051), D39 (SPD_0930-SPD_0931), *S. suis* 05ZYH33 (05SSU0937-05SSU0936) and *S. pyogenes* plasmid pSM19035 (*Epsilon-zeta*).

2.2 *SezAT* 的转录分析

为验证 *sezAT* 是否属同一操纵子控制及其与相邻基因的转录情况, 首先对 *sezAT* 及其两侧基因进行生物信息学分析。利用 BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 发现在 *sezA*(05SSU0937)上游 106 bp 处有一个可能的启动子区域, 利用 Softberry 网站(<http://www.softberry.com/berry.phtml>)上的 FindTerm 软件在 05SSU0933–05SSU0934 基因间区域预测有转录终止子的存在, 提示 05SSU0934–05SSU0937 这 4

个基因可能为共转录单位(图 2A)。为了验证预测结果的正确性, 我们以 05ZYH33 总 RNA 逆转录生成的 cDNA 为模板, 通过特异性引物进行 PCR, 设立基因组 DNA 做对照。结果如图 2B 所示, 当以基因组 DNA 为模板时, 5 对引物均扩增出与理论值大小相符的特异条带, 而以 cDNA 为模板 (RT-PCR)时, 仅有 P3/P4, P5/P6, P7/P8 扩增出条带, P1/P2 和 P9/P10 未见扩增条带, 表明 05SSU0934–05SSU0937 这 4 个基因是共转录基因, 即 *sezA* 和 *sezT* 同属于一个操纵子。

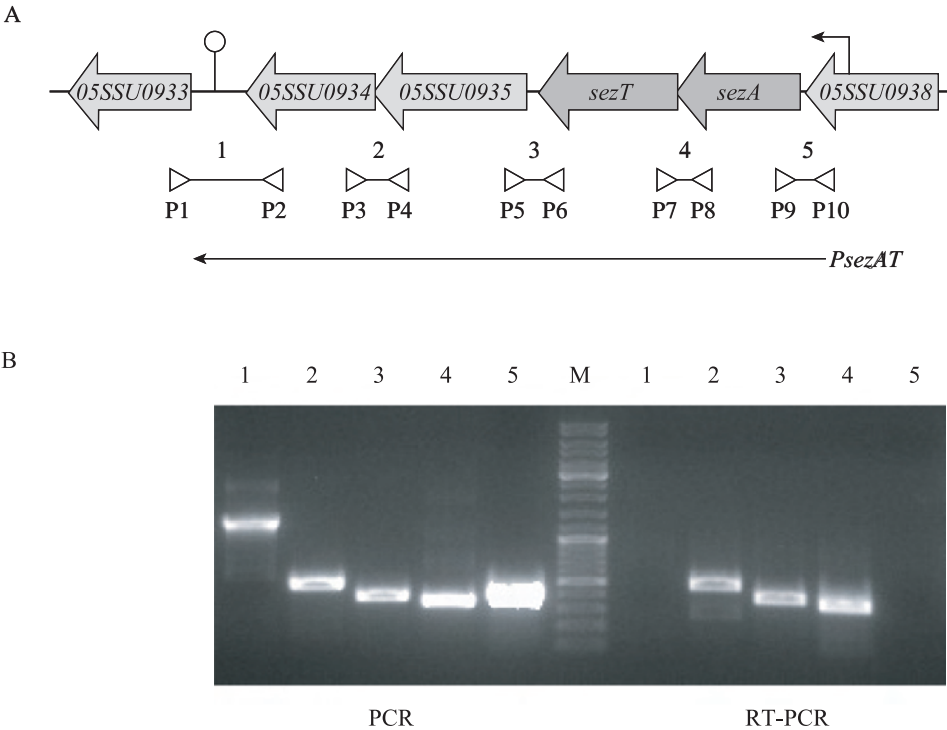


图 2 *sezAT* 及相邻基因的转录分析

Fig. 2 Transcriptional analysis of the *sezAT* locus and its flanking genes of *S. suis* 05ZYH33
注: A: *sezAT* 及其相邻基因(非比例)的排列组成, 软件预测的启动子区域(横折箭头表示)位于 05SSU0938 内部, 转录终止位点(茎环结构表示)位于 05SSU0933–0934 之间, RT-PCR 所用的 5 对引物及其相应位置如图所示; P_{sezAT} 表示 05SSU0934–0937 可能为一个共转录单位. B: *sezAT* 及其相邻基因的 RT-PCR 分析, 左侧为 05ZYH33 基因组 DNA 模板的 PCR, 右侧为以 cDNA 模板的 RT-PCR.
Note: A: Genomic organization of the *sezAT* locus and its flanking genes in *S. suis* 05ZYH33 (not drawn to scale). The fold arrow represents the predicted promoter located in 05SSU0938, and the stem-loop structure represents potential transcriptional terminator. The location of the primer pairs used in RT-PCR analysis are indicated by inverted arrowheads. P_{sezAT} indicates 05SSU0934–0937 may be transcribed as a single operon. B: RT-PCR analysis of the *sezAT* locus and its flanking genes. 05ZYH33 genomic DNA and total RNA were analysed by PCR (left) and RT-PCR (right), respectively. The GeneRuler Mix DNA ladder marker is shown in the middle (M).

2.3 SezAT 的活性测定

为检测 *SezT* 和 *SezA* 的毒性和抗毒性作用,我们将这两个编码基因分别克隆在含有 PBAD 和 Plac 双启动子的 pJS298 质粒上(图 3A)。含有 pJS298 空质粒的细菌,无论加入 IPTG 还是阿拉伯糖诱导,其生长繁殖与 BL21 无明显差异。含 pJS-A 质粒的菌株,在加入 IPTG 后细菌的生长未受影响。含有 pJS-AT 的菌株,如图 3B 所示,在均不加 IPTG 或阿拉伯糖(-,-)或只加入 IPTG (I,-)的情况下,细菌能正常生长,而当只加入阿拉伯糖(-,A)时,细菌生长明显受限, OD_{600} 值在加入阿拉伯糖后 1-3 h 急剧下降,3-6 h 内 OD_{600} 维持在 0.4-0.5 低值,表明加入阿拉伯糖诱导 *SezT* 毒素发挥毒性对细菌生长起抑制作用。当 *SezA* 与 *SezT* 同时诱导表达(I,A)时,未出现明显的细菌生长受限(图 3B、3C),说明 *SezA* 可中和 *SezT* 对细菌生长的毒性作用。不同于(-,-)和(I,-)组的是,(I,A)组的 OD_{600} 值稍低,可能原因是两种诱导剂及启动子诱导表达水平不一,导致 *SezT* 仍发挥部分作用使得细菌生长繁殖相对缓慢^[12]。通过对每一时间点的菌液稀释涂板进行活菌计数,所得结果与 OD_{600} 检测数据吻合,单纯诱导表达 *SezT* 的活菌数比同时时间点的其他组细菌都少许多(图 3D),而同时诱导两种蛋白表达的细菌计数与(-,-)和(I,-)组相比无明显差异。

2.4 毒素编码基因 *sezT* 的敲除

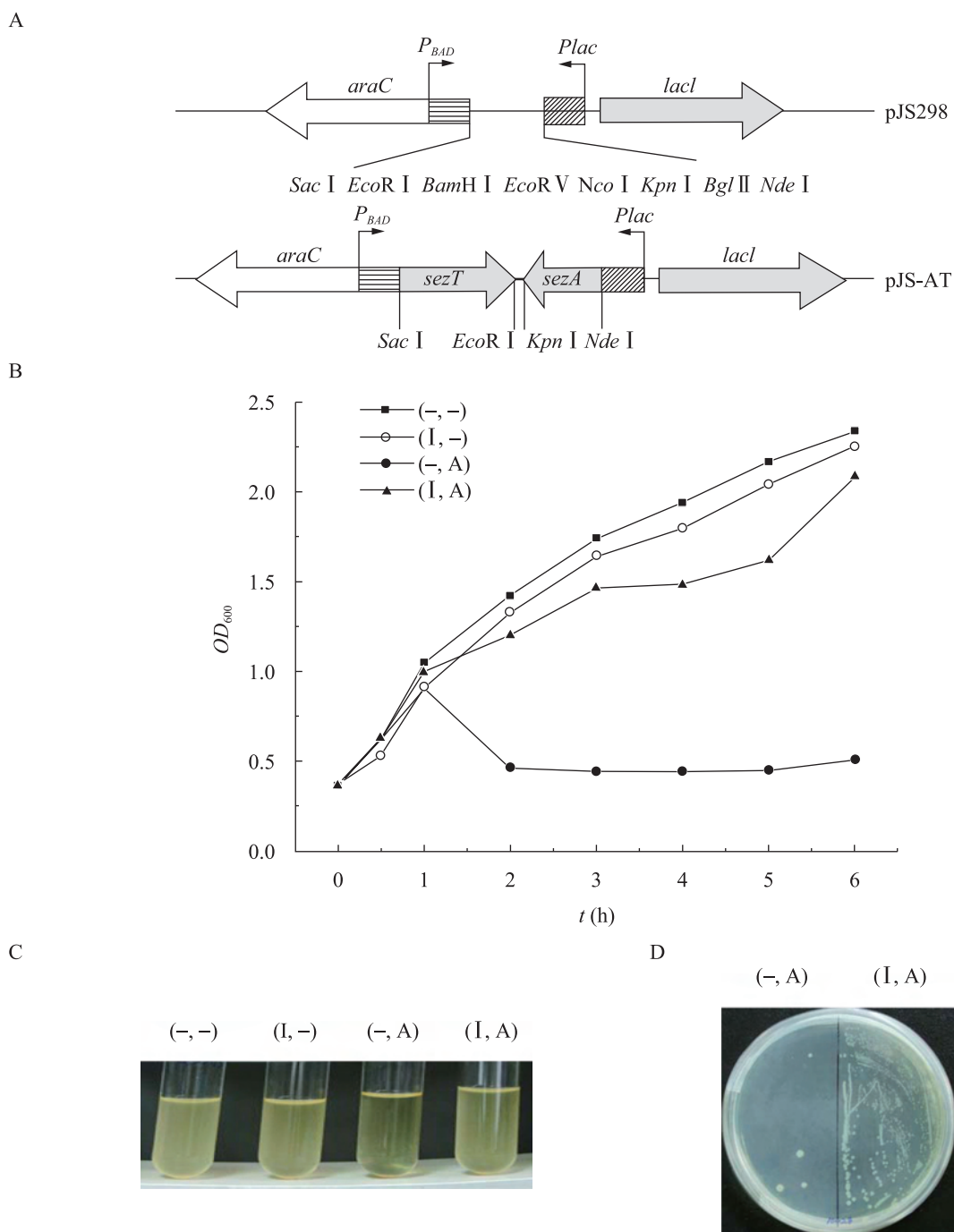
为进一步验证 *SezAT* 的生物学功能,我们构建了敲除质粒 pUC::*sezT* 和 pUC::*sezAT*,电转化 05ZYH33 感受态细菌,结果我们筛选 48 个转化子便得到了 3 株 *sezT* 敲除的突变株($\Delta sezT$),阳性率 6.25%。如图 4B 所示,野生株 05ZYH33 因含有 *sezT* 基因而不含壮观霉素基因,故泳道 1、3、5 为 PCR 阳性,而泳道 7、9、11 均为 PCR 阴性;在 $\Delta sezT$ 敲除突变株中,因 *sezT* 被壮观霉素基因取代,故泳道 2、4、6 为 PCR 阴性,而泳道 8、

10、12 均为 PCR 阳性,泳道 13、14 可见同源臂外侧引物 OUT-F/R 的 PCR 产物片段有大小差异,因为原来的 *sezT* 基因(774 bp)被替换成了更大的壮观霉素基因(1 130 bp)。将野生株和突变株 OUT-F/R 扩增产物克隆 pMD19-T 后送测序,结果也明确显示 *sezT* 被壮观霉素基因替换。然而,经过筛选近 800 余个转化子,我们均未能获得整个 *sezAT* 编码基因敲除的突变株。

3 讨论

TA 系统最初发现于细菌低拷贝质粒中^[13],在细菌生长繁殖中发挥稳定低拷贝质粒的作用,若细菌在分裂时丢失该质粒则子代细菌不能存活,所以又叫细菌分裂后杀伤系统(Post-segregational killing system)。根据抗毒素的性质可将 TA 系统分为两型: I 型 TA 系统其抗毒素基因编码产物为反义 RNA,如在 *hok/sok* 系统中, *mok* 是 *hok* (毒素)翻译必须的蛋白, *sok* (抗毒素基因)通过转录出反义 RNA 来抑制 *mok* 的翻译,从而拮抗 *hok* 基因的活性^[4]; II 型 TA 系统的抗毒素实质为蛋白质,该蛋白通过与毒素蛋白结合形成稳定无毒的复合物以中和毒性作用。在已研究的 II 型 TA 系统中,抗毒素蛋白的半衰期相对于毒素蛋白都更短,这可能与细菌中一些特异性蛋白酶如 Lon 或 Clp 等可降解抗毒素蛋白以及蛋白本身空间构象和热稳定性相关^[14-15]。因为抗毒素蛋白降解快,为中和更稳定的毒素蛋白,只有维持抗毒素蛋白的表达以求平衡,所以 TA 系统又称为成瘾模块(Addiction modules)。

近年研究发现 TA 系统不仅存在质粒中,在真细菌和古细菌基因组中都存在数量庞大的 TA 系统。基因组序列分析发现,在硬壁菌门的细菌基因组中 TA 系统的拷贝数相对要低^[16]。2009 年 Makarova 团队通过分析 750 个完整的基因组,发现这些基因组中可能存在高达 12 种全新的毒素

图 3 *SezAT* 的活性测定Fig. 3 Activity determination of *SezAT*

注: A: 重组质粒 pJS-AT 结构示意图, pJS298 为空质粒, pJS-AT 为分别插入 *sezA* 和 *sezT* 的重组质粒; B: 加入不同诱导剂(IPTG/阿拉伯糖)后 *E. coli* BL21(pJS-AT)的生长曲线; C: 加入诱导剂 3 h 后细菌的生长状态; D: 加入诱导剂 3 h 后取细菌(10^{-3} 涂板. 其中“T”代表 IPTG, “A”代表阿拉伯糖, “-”代表未加入诱导剂.

Note: A: Physical map of the pJS298 plasmid and the pJS-AT recombinant plasmid with cloned *sezA* and *sezT*. B: Growth curves of *E. coli* BL21 harboring pJS-AT with the addition of different inducers (IPTG/arabinose). C: Growth states of *E. coli* BL21(pJS-AT) in LB medium after 3h induction with different inducers. D: Growth states of *E. coli* BL21(pJS-AT) on Kana LB agar plate (10^{-3} dilutions) after 3h induction with different inducers. “T”, “A”, and “-” represent IPTG, arabinose, and neither, respectively.

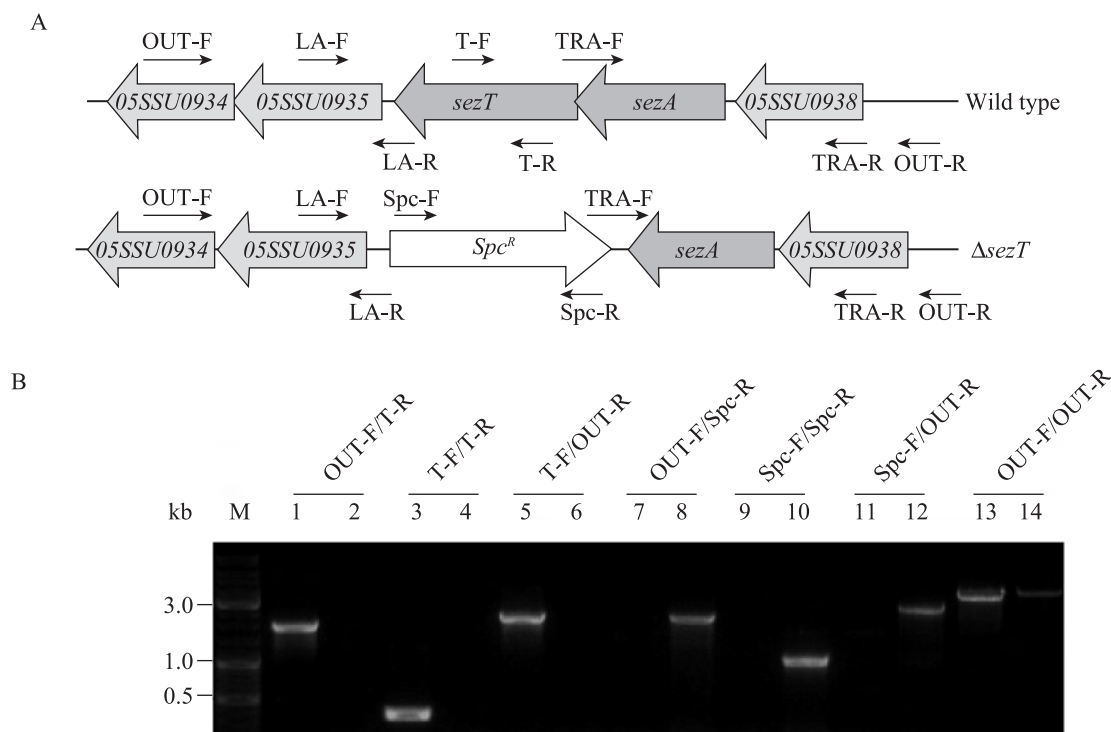


图 4 敲除突变株 $\Delta sezT$ 的构建及鉴定

Fig. 4 Construction and confirmation analysis of the knockout mutant strain $\Delta sezT$

注: A: 毒素基因 *sezT* 的敲除策略, 同源重组后 *sezT* 被壮观霉素基因盒(*Spc^R*)替换; B: *sezT* 基因敲除突变株($\Delta sezT$)的多重 PCR 验证, 单数泳道(1, 3, 5, 7, 9, 11, 13)的 PCR 模板为野生株 05ZYH33 基因组 DNA, 双数泳道(2, 4, 6, 8, 10, 12, 14)的 PCR 模板为突变株 $\Delta sezT$ 基因组 DNA, 所用 PCR 引物标注于各泳道上方。

Note: A: Strategy for deletion mutagenesis of *sezT* by allelic replacement with a spectinomycin resistance cassette (*Spc^R*). B: Multiple-PCR analysis of the $\Delta sezT$ mutants. The primer combinations used in PCR are presented upon the lanes. Genomic DNA from the wild type strain 05ZYH33 (lane 1, 3, 5, 7, 9, 11, and 13) and the $\Delta sezT$ mutants (lane 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14) were used as templates. The GeneRuler Mix DNA ladder marker is shown to the left (M).

蛋白和 13 种抗毒素蛋白^[17]。有意思的是在绝大多数严格胞内寄生细菌的基因组没有或含有丧失功能的 TA 系统, 而胞外菌则可以数十个 TA 系统结构^[15]。目前关于细菌染色体上 TA 系统的功能还存在许多争议, 但为了解释研究中出现的现象学者们提出了不同的假说, 如生存应激作用, 控制生长繁殖, 程序性细胞死亡, 持留菌形成(Persister formation), 稳定基因组功能以及抗成瘾作用^[18], 其中的稳定基因组功能为我们所关注。

对我国高致病性 SS2 菌株 05ZYH33 基因组序列分析发现有 4 对 TA 系统存在, 其中只有一

对位于 89K 毒力岛内, 即 SezAT。为验证 SezAT 构成一对有功能的 TA 系统, 我们首先通过 RT-PCR 方法证实 *sezA* 和 *sezT* 为一对共转录基因; 同时, 构建的含双启动子的质粒 pJS-AT 在 BL21 中分别诱导表达 SezA 和 SezT, 证实 SezT 为毒素蛋白, 对细菌的生长有抑制作用, 而 SezA 为抗毒素蛋白, 能中和 SezT 的毒性作用; 结合 05ZYH33 基因组上的序列结构特点可以推断, SezAT 构成了一对有活性的 TA 系统。通过前期建立成熟的基因敲除技术平台, 我们成功敲除了毒素编码基因 *sezT*, 但始终未能得到整个 SezAT 系统的敲除突变株, 这也从侧面反映了 SezAT 的

活性, 即不能单独敲除抗毒素基因 *sezA* 或同时敲除整个 SezAT 系统, 否则细菌在残存的毒素蛋白的作用下将不能存活^[6,19]。

有文献报道 *Vibrio vulnificus*(一种嗜盐弧菌) 上的超级整合子由一百多个基因组成, 这些基因极其稳定, 没有大片段的丢失或重排。其中有 2 对 TA 系统发挥着稳定整合子基因的作用, 而表达量高的 TA 系统其稳定作用更强^[6]。Waldor 团队从临床分离的一株霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) 中发现一个 100 kb 大小的基因组岛 SXT, SXT 是属于 ICEs (Integrating and conjugative elements) 的一种可移动遗传元件, SXT 上有多个耐药基因以提供耐药性^[20]。近年研究发现在霍乱弧菌的 2 号染色体上有数十对 TA 系统, 且都位于该 SXT 上^[15]。Gerdes 等对 SXT 上两对 *higBA* 研究发现其可发挥稳定低拷贝质粒的作用, 推测其可能有稳定 SXT 的功能^[21]; Waldor 团队发现 *parDE* 位点参与到维持超级整合子的完整性和维持 2 号染色体遗传稳定性^[22], 随后在 SXT 中发现一类新的 TA 系统——*mosAT*, 也参与到 SXT 的稳定过程当中, 且 *mosAT* 的表达量会随着影响 SXT 切离环化的提高而提高, 以维持 SXT 环形分子在细菌中的稳定传代^[23]。对于 05ZYH33 上的 89K 毒力岛, 其切离环化及复制机制与霍乱弧菌上 SXT 极其相似, 均是以单个环化分子存在细菌中, 如何保证其在细菌传代过程中不被丢失呢? 是否 SezAT 也具有稳定 89K 毒力岛结构的功能呢? 我们下一步将以 SezAT 系统失活的突变菌株 $\Delta sezT$ 为对象, 看是否能筛选到 89K 毒力岛缺失突变株, 为揭示 89K 毒力岛在我国高致病性 SS2 的作用奠定基础。同时, 这种 89K 毒力岛缺失的突变株将具有发展成为新的疫苗候选株的前景。

参 考 文 献

- [1] Tang JQ, Wang CJ, Feng YJ, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. PLoS Medicine, 2006, 3(5): e151.
- [2] Chen C, Tang JQ, 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.
- [3] Li M, Shen XD, Yan JH, et al. GI-type T4SS-mediated horizontal transfer of the 89K pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Molecular Microbiology, 2011, 79(6): 1670–1683.
- [4] Gerdes K, Wagner EGH. RNA antitoxins[J]. Current Opinion in Microbiology, 2007, 10(2): 117–124.
- [5] Khoo SK, Loll B, Chan WT, et al. Molecular and structural characterization of the PezAT chromosomal toxin-antitoxin system of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(27): 19606–19618.
- [6] Szekeres S, Dauti M, Wilde C, et al. Chromosomal toxin-antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection[J]. Molecular Microbiology, 2007, 63(6): 1588–1605.
- [7] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*[J]. Plasmid, 2001, 46(2): 140–148.
- [8] 常家宁, 宁德刚. 蓝细菌 PCC6803 染色体上的一对毒素-抗毒素基因的鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 31–36.
- [9] Sevin EW, Barloy-Hubler F. RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes[J]. Genome Biology, 2007, 8(8): R155.
- [10] Gerdes K, Christensen SK, Løbner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(5): 371–382.
- [11] Mutschler H, Gebhardt M, Shoeman RL, et al. A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis[J]. PLoS Biology, 2011, 9(3): e1001033.
- [12] Guzman LM, Belin D, Carson MJ, et al. Tight

- regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(14): 4121–4130.
- [13] Austin SJ. Bacterial plasmids that carry two functional centromere analogs are stable and are partitioned faithfully[J]. *Journal of Bacteriology*, 1984, 158(2): 742–745.
- [14] Cherny I, Overgaard M, Borch J, et al. Structural and thermodynamic characterization of the *Escherichia coli* RelBE toxin-antitoxin system: indication for a functional role of differential stability[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(43): 12152–12163.
- [15] Mutschler H, Reinstein J, Meinhart A. Assembly dynamics and stability of the pneumococcal epsilon zeta antitoxin toxin (PezAT) system from *Streptococcus pneumoniae*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(28): 21797–21806.
- [16] Pandey DP, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(3): 966–976.
- [17] Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes[J]. *Biology Direct*, 2009, 4: 19.
- [18] Magnuson RD. Hypothetical functions of toxin-antitoxin systems[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(17): 6089–6092.
- [19] Budde PP, Davis BM, Yuan J, et al. Characterization of a *higBA* toxin-antitoxin locus in *Vibrio cholerae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(2): 491–500.
- [20] Waldor MK, Tschäpe H, Mekalanos JJ. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(14): 4157–4165.
- [21] Christensen-Dalsgaard M, Gerdes K. Two *higBA* loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(2): 397–411.
- [22] Yuan J, Yamaichi Y, Waldor MK. The three *Vibrio cholerae* chromosome II-encoded ParE toxins degrade chromosome I following loss of chromosome II[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(3): 611–619.
- [23] Wozniak RAF, Waldor MK. A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element[J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(3): e1000439.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。