

高致病性 2 型猪链球菌 *plcR* 基因敲除株的构建及其相关生物学特性的研究

陈恬 李明 赵岩 殷素鹏 姚新月 钟秋 谭银玲 胡福泉*

(第三军医大学基础部微生物教研室 重庆 400038)

摘要:【目的】构建高致病性 2 型猪链球菌 05ZYH33 菌株 *plcR* 基因敲除株, 通过比较突变株与野生株生物学特性的差异, 研究 *plcR* 基因在 2 型猪链球菌致病过程中的作用。【方法】利用同源重组技术敲除 *plcR* 基因, 多重交叉 PCR 及 RT-PCR 鉴定并测序验证。比较野生株与突变株基本生物学特性的差异, 小鼠攻毒实验分析 *plcR* 基因缺失对细菌毒力的影响。【结果】经 RT-PCR 证实 05SSU0241 与 05SSU0242 共转录, 通过多重交叉 PCR 及 RT-PCR 证实成功构建 *plcR* 基因缺失突变株, 基本生物学特性显示突变株的生长速率、菌落形态、溶血活性均无显著改变, 小鼠致病性试验结果显示, 野生株攻毒的小鼠死亡率为 70%, 突变株攻毒的小鼠死亡率为 40%, 毒力较野生株显著降低。【结论】*plcR* 基因作为 2 型猪链球菌有毒株基因组中特有的外源基因, 在细菌致病过程中具有重要作用。

关键词: 2 型猪链球菌, 转录调控因子, *plcR* 基因, 敲除

Construction and characterization of *plcR* gene knockout mutant of *Streptococcus suis* serotype 2

CHEN Tian LI Ming ZHAO Yan YIN Su-Peng YAO Xin-Yue ZHONG Qiu
TAN Yin-Ling HU Fu-Quan*

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

Abstract: [Objective] To construct the *plcR* gene knockout mutant of *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) highly virulent strain 05ZYH33 and analyze the role of *plcR* in the pathogenesis of SS2. [Methods] The *plcR* gene was replaced with a spectinomycin resistance cassette through homologous recombination, then multiple-PCR, RT-PCR, and sequence analysis were performed to identify the knockout strain $\Delta plcR$. The effects of *plcR* deletion on the basic biological characteristics and virulence of SS2 were then determined in this study. [Results] The results of RT-PCR confirmed that 05SSU0241 and 05SSU0242 should be transcribed as a single operon. The isogenic mutant $\Delta plcR$ was successfully constructed verified by multiple-PCR and RT-PCR. No significant differences in biological characteristics, including growth rate, colony morphology and hemolytic activity, were de-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31370169)

*通讯作者: Tel: 86-23-68752834; 信箱: hufuquan2009@aliyun.com

收稿日期: 2013-11-25; 接受日期: 2014-01-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-09

tected between the two strains. Pathogenic trial in mouse showed that wild-type strain induced high fatality rate as much as 70%, whereas the $\Delta plcR$ mutant caused a 40% fatality rate. Obviously that the virulence of the $\Delta plcR$ mutant was attenuated remarkably compared with the wild type. [Conclusion] The *plcR* gene, a foreign gene exclusively existed in virulent SS2 strains, plays an important role in the pathogenesis of SS2 infection.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2, Transcriptional regulator, *plcR* gene, Knockout

2 型猪链球菌(*Streptococcus suis* serotype 2, *S. suis* 2 或 SS2)是一种重要的人畜共患传染病病原体。SS2 感染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,并且可通过伤口和呼吸道等传播途径,导致人的感染发病和死亡。本病呈全球性分布,不仅给全世界养猪业造成巨大的经济损失,而且对相关从业人员的健康亦构成严重威胁,已成为重要的新发传染病病原体^[1-3]。尤为值得注意的是,我国 1998 年江苏省和 2005 年四川省大规模暴发的两起 SS2 感染人的公共卫生事件,引起 200 余例感染,病死率高达 62.3%–81.3%,为历史罕见^[4]。由于该菌严重威胁着公共卫生安全,已引起国内外研究人员的广泛关注。

既往对 SS2 毒力因子的研究主要集中于单个毒力因子的致病性方面,目前已经发现多种 SS2 毒力因子,包括荚膜多糖(Capsule polysaccharide)、溶血素 (Suilysin)、溶菌酶释放蛋白 (Muramidase-released protein)、胞外蛋白因子 (Extracellular factor)、纤连蛋白-纤维蛋白原结合蛋白 (Fibronectin- and fibrinogen -binding protein) 等^[5-7],然而这些毒力因子是如何参与致病过程以及各毒力因子在此过程中有何贡献,至今仍不清楚。研究表明,在 SS2 致病过程中,这些毒力因子的表达并不是始终不变的,而是随着转录调控因子的调控发生着变化。因此,弄清转录调控因子是如何发挥转录调节作用这一问题,将为进一步探索 SS2 致病机制提供依据。本课题组前期利用基因芯片和比较基因组学技术,系统分析了 18 株不同毒力和来源的 SS2 菌株基因组,鉴定出强毒株携带一些特有的毒力因子,如转录调控因子 PlcR (Pleiotropic regulator)、脂酶 Lipase、分选酶 Sortase、

菌毛相关蛋白、反应调控因子 RevS 和 CtsR 等^[8]。其中分选酶、反应调控因子 RevS 等的功能研究已有相关文献报道^[9-10],而转录调控因子 PlcR 作为一个广泛存在于芽胞杆菌属中的主要毒力调节因子,目前尚未见文献报道其在链球菌属中具有调控作用,因此它引起了我们的兴趣。

转录调控因子 PlcR 是一个广泛存在于蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)和苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)中的多效调控因子,可激活多种毒力因子的转录,包括调控磷脂酶 C (Phospholipase C)、溶血素(Hemolysin)、蛋白酶(Protease)、细胞表面蛋白 (Cell surface protein)、膜破坏毒素 (Membrane-damaging toxin)等的表达^[11-13]。通过生物信息学分析,我们发现在 SS2 强毒株 05ZYH33 (2005 年四川流行株)基因组中存在两个连续的 *plcR* 同源基因 (基因编号为 05SSU0241 和 05SSU0242),然而这两个基因是否真实表达且具有生物学活性尚不清楚,且目前尚未见文献报道 PlcR 在链球菌属中是否也参与了毒力的调控。为研究这一问题,我们通过同源重组的方法,构建了这两个基因同时缺失的突变株,比较其与野生株 05ZYH33 生物学特性的差异,为系统研究 PlcR 因子调节毒力的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、引物、实验动物及培养方法

本实验所用的菌株、质粒及引物见表 1 和表 2,引物由华大基因合成。BALB/c 小鼠购自本校实验动物中心,雌性,4–5 周龄(15 g 左右),SPF 级。微孔板检测仪(酶标仪) SpectraMax M2/M2e 购于 Molecular Devices 公司。SS2 在 Todd-Hewitt broth (THB) (Difco Laboratories, Detroit, MI)并添加 2%

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 Bacterial strains/Plasmids	特征/功能 Characteristics/Function	来源 Source
<i>S. suis</i> 05ZYH33	Virulent strain of SS2 isolated from patients with a toxic shock-like syndrome	Lab collection
<i>S. suis</i> Δ <i>plcR</i>	The deletion mutant of <i>plcR</i> with background of 05ZYH33, Spc^r	This study
<i>E. coli</i> DH5 α	Cloning host for maintaining the recombinant plasmids	Lab collection
pUC18	Cloning vector; Amp^r	Lab collection
pMD19-T	Cloning vector; Amp^r	TaKaRa
pSET4s	Thermosensitive suicide vector in <i>S. suis</i> ; Spc^r	[14]
pUC18-LSR	A recombinant vector with the background of pUC18, designed for knockout of <i>plcR</i> ; Amp^r ; Spc^r	This study

表 2 本实验所用引物 Table 2 Primers used in this study		
引物名称 Primers	序列 Sequence (5'→3')	酶切位点 Restriction sites
LA-F	<u>GAATTC</u> ATGCTGAGATGAAGTGGG	<i>EcoR</i> I
LA-R	<u>GGATCC</u> TTACATCTTAAATAAAAT	<i>Bam</i> H I
RA-F	<u>GTCGAC</u> TAATCAAGTATAGATTCT	<i>Sal</i> I
RA-R	<u>GCATGC</u> TCACATACAGCACCCCTTT	<i>Sph</i> I
Spc-F	<u>GGATCC</u> GTTTCGTGAATACATGTTA	<i>Bam</i> H I
Spc-R	<u>GTCGAC</u> TTTCTAAAATCTGAT	<i>Sal</i> I
in-F	CCTTATCACAACGCTTACA	
in-R	CTTATCTCGCAATGTTTCA	
0241-F	GAAGAAAGGAACTTGGCT	
0241-R	TAGGAACGAGTGAACAGA	
0242-F	GGAAGAACTTAGTCATCGAA	
0242-R	ATAACTATTTTGGCGACC	
GAPDH-F	TATTTTCTGTATTTTTC	
GAPDH-R	GAAAAAATACAGAAAATA	
out-F	ACAGTTAGCGGACGAGAT	
out-R	CAACAGTTGTTCAGCAT	

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。必要情况下添加抗生素(Sigma),各抗生素的工作浓度分别为:氨苄青霉素 100 mg/L,四环素 5 mg/L,壮观霉素 100 mg/L。

1.2 生物信息学分析

利用美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)上所提供的相似性比对工具(Basic local alignment search tool, BLAST)对 *plcR* 基因编码产物进行检索分析,再运用 Pfam 软件(<http://pfam.sanger.ac.uk>)和 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)预测其功能。

1.3 基因敲除株的构建

1.3.1 基因敲除质粒的构建:以 05ZYH33 野生株基因组为模板,分别扩增 *plcR* 上下游约 1 000 bp 大小的同源片段。同时以质粒 pSET4s 为模板,扩增质粒上的壮观霉素抗性基因盒(Spc^r),然后通过酶切连接的方法将 3 个片段依次克隆到 pUC18 中,形成一个 Spc^r 两侧具有 *plcR* 上下游同源臂的敲除质粒 pUC18-LSR。

1.3.2 *plcR* 基因敲除株的筛选与鉴定:参考 Smith 等^[15]的方法制备 SS2 05ZYH33 的感受态细胞。在 25 μ F、2.25 kV、200 Ω 参数条件下,将敲除质粒 pUC18-LSR 电转化 05ZYH33 感受态细胞,37 $^{\circ}$ C、160 r/min 摇床培养 2 h 后,接种于壮观霉素抗性的 THY 平板上,挑取平板上的单菌落用 *plcR* 内部引物 in-F/in-R 进行 PCR 初筛,再将 PCR 初筛阴性的可疑突变菌株进行多重交叉 PCR 并将 PCR 产物送华大基因测序鉴定。

1.4 基因的转录情况分析 & RT-PCR 鉴定

挑取 05ZYH33 单菌落及测序验证正确的突变株($\Delta plcR$)单菌落于 THY 中 37 °C、200 r/min 摇床培养过夜,次日将过夜菌液按 1:100 比例接种至新鲜 THY 中培养至对数生长期后期(OD_{600} 为 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 05SSU0241 与 05SSU0242 是否共转录,并且鉴定突变株中 *plcR* 基因不再转录,分别以 05ZYH33 基因组 cDNA 以及突变株 cDNA 为模板,用扩增各基因间特异引物(in-F/in-R, 0241-F/0241-R, 0242-F/0242-R, 0241-F/0242-R)进行 PCR,设立 *gapdh* 看家基因作对照,反应结束后各取 5 μ L PCR 产物进行电泳,观察结果。

1.5 野生株与敲除株基本生物学性状的比较

1.5.1 生长速率的比较:在相同培养条件下,挑取野生株 05ZYH33 和突变株 $\Delta plcR$ 单菌落,分别接种于 5 mL THY 培养基中,37 °C 振荡培养 18 h,次日取过夜菌液测 OD_{600} 。用 THY 培养基将二者稀释成相同的浓度。接种于 0.5 mL THY 中,用酶标仪每 2 h 测一次 OD_{600} ,将所得数据绘制生长曲线,比较二者有无差异。

1.5.2 溶血性的比较:将 05ZYH33 和 $\Delta plcR$ 用三线法分别接种于 THY 琼脂血平板上(含 6%兔血),于 37 °C 孵箱培养 36 h,观察二者菌落形态及溶血活性是否存在差异。

1.6 动物实验

参考赵岩等^[16]的方法,从平板上分别挑取 05ZYH33 和 $\Delta plcR$ 单菌落,于 THY 培养基中 37 °C 振荡培养 18–24 h。将菌液以 1:100 传代接种于新鲜的不含抗性的 THY 培养基中,37 °C 静置培养至 $OD_{600}=1.0$ (5.0×10^8 CFU/mL),再用新鲜 THY 将菌液稀释 50 倍(即菌液为 10^7 CFU/mL)。使用腹腔注射的方法,取两种菌株的菌液各 1 mL 分别攻击 BALB/c 小鼠,每组 20 只。密切观察动物感染后

的体征,比较两组小鼠的发病情况及存活时间的差异。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

氨基酸同源性比对结果显示,在 05ZYH33 基因组中,05SSU0241 基因编码产物与蜡样芽胞杆菌 PlcR 蛋白的相似性为 46%,05SSU0242 基因编码产物与 PlcR 蛋白的相似性为 28%。其中 05SSU0241 编码产物存在一个 λ 抑制子样 DNA 结合结构域(Lambda repressor-like DNA binding domain),这一结构域为特异的 DNA 结合区域,许多具有此结构域的蛋白都发挥转录调节子的作用^[17]。05SSU0242 所编码的蛋白存在一个肽重复序列结构域(Tetratricopeptide repeat),这种结构域可介导蛋白质相互作用,并在一些重要的蛋白复合物的形成中扮演重要角色^[18]。但这两个分子在 SS2 中是否有调控转录活性,尚需要深入实验研究。

2.2 *plcR* 基因敲除株的构建及鉴定

为研究 *plcR* 基因在 SS2 中的生物学作用,将构建好的敲除质粒 pUC18-LSR 电转化 05ZYH33 感受态细胞,于壮观霉素抗性平板上初筛敲除突变株,分别用 7 对引物进行 PCR 鉴定,结果如图 1 所示。在 *plcR* 敲除株中不能有 *plcR* 内部引物扩增产物出现,因为 *plcR* 已被大小为 1 130 bp 的 *Spc^r* 基因所替换,进行多重 PCR 以进一步排除单交换的可能。再以野生株和突变株基因组为模板,以同源臂外侧的 out-F/out-R 为引物,获得 PCR 产物后送往华大基因测序,结果证实 *plcR* 成功被 *Spc^r* 基因替代。

2.3 基因的转录情况分析 & RT-PCR 结果分析

为验证 05SSU0241 与 05SSU0242 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 05SSU0241 与 05SSU0242 及其两侧基因进行生物信息学分析。利用 Softberry 网站(<http://www.softberry.com/berry.phtml>)上的 BPRM 软件分析 05SSU0241 上游序列,发现 05SSU0241 上游 21 bp

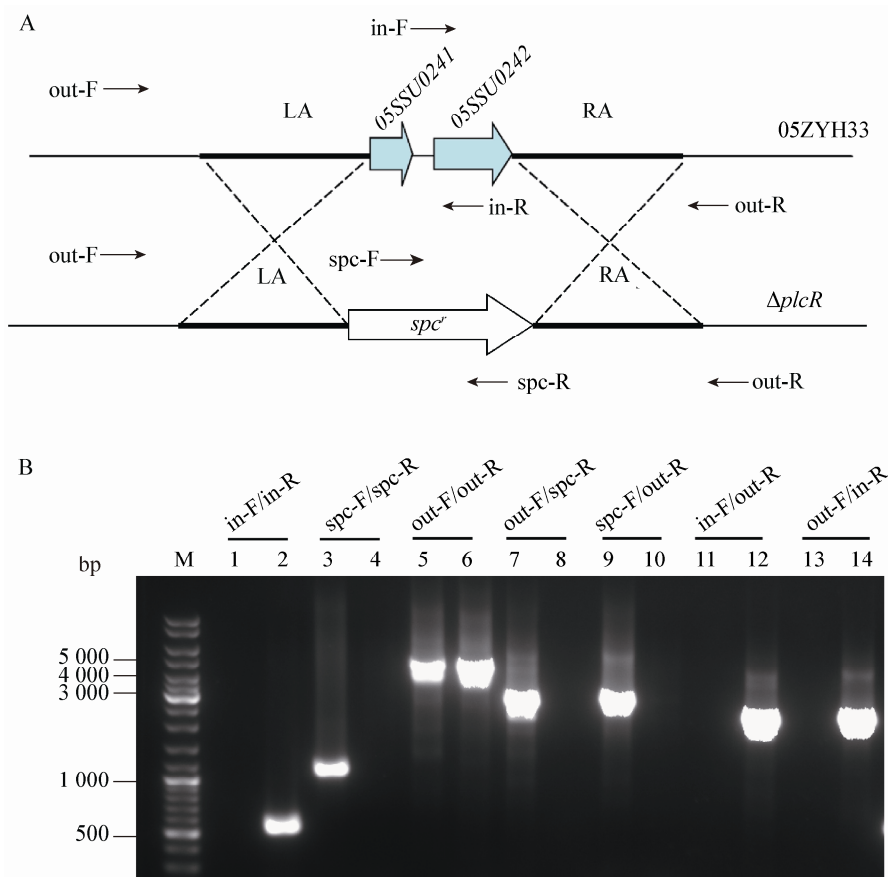


图1 *plcR* 基因敲除株的构建及鉴定

Figure 1 Construction and confirmation analysis of the knockout mutant strain $\Delta plcR$

Note: A: Strategy for deletion mutagenesis of *plcR* by allelic replacement with a spectinomycin resistance cassette (*spc^r*). B: Confirmatory PCRs of the $\Delta plcR$ mutant. The primer pairs used in the multiple-PCR analysis are indicated above the lanes. Genomic DNAs from the mutant *plcR* strain (lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13) and the wild-type strain, 05ZYH33 (lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14), were used as templates. The Gene Ruler Mix DNA ladder marker is shown to the left (M).

处有一个可能的启动子区域。再利用 Softberry 网站上的 FindTerm 软件分析 05SSU0242 下游序列, 预测出在 05SSU0242 与 05SSU0243 基因间区域, 即 05SSU0242 下游 23 bp 处存在一个转录终止子区域, 提示 05SSU0241 与 05SSU0242 这两个基因可能为共转录单位。为验证 05SSU0241 与 05SSU0242 共转录, 且突变株中不再有 *plcR* 基因转录本, 分别以 05ZYH33 以及突变株 cDNA 为模板, 通过特异性引物进行 PCR, 结果如图 2D 所示。*plcR* 内部引物无法扩出突变株相应条带, 证实突变株中 *plcR* 基因已不存在, 而 0241-F/0241-R、

0242-F/0242-R 和 0241-F/0242-R 以野生株 cDNA 为模板可扩增出相应的特异条带, 而以突变株 cDNA 为模板却无法扩出相应条带, 说明 05SSU0241 与 05SSU0242 共转录, 且在突变株中不再存在。

2.4 野生株与突变株基本生物学特性的比较结果

将野生株 05ZYH33 和敲除株 $\Delta plcR$ 分别接种于 THY 液体培养基中于 37 °C 摇床振荡培养 48 h, 二者生长速率相近, 生长情况相仿, 并无显著差异。血平板上观察二者的菌落形态和溶血环大

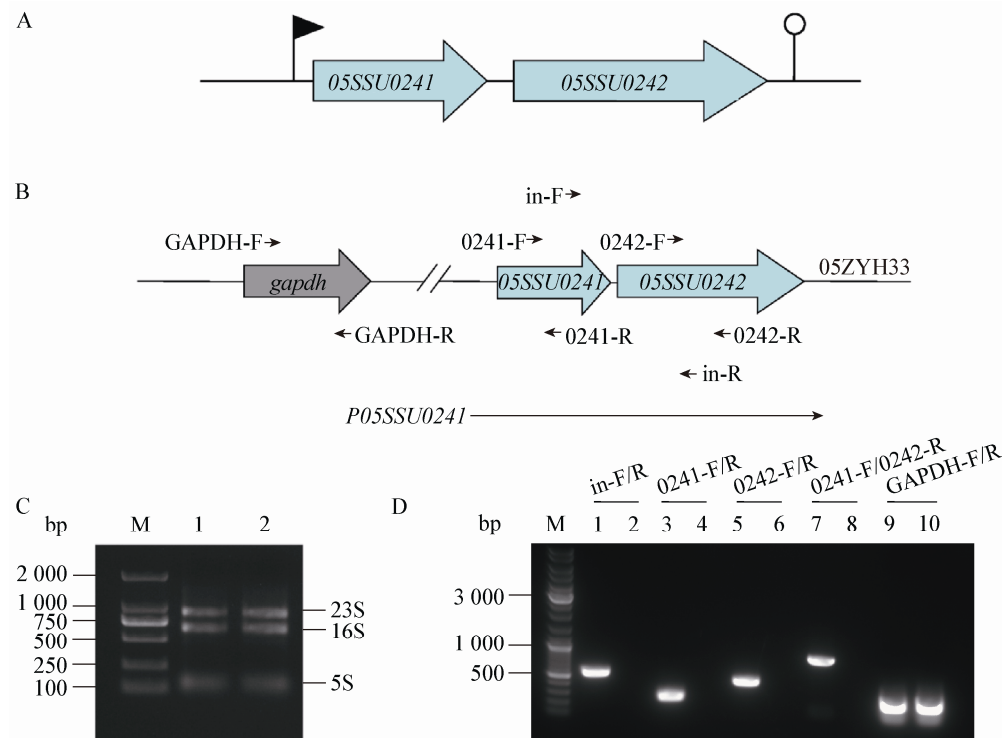


图 2 *plcR* 基因的转录分析

Figure 2 Transcriptional analysis of the *plcR* genes

Note: A: The sketch map of promoter and terminator prediction. 05SSU0241 and 05SSU0242 are shown as blue-green arrows (not drawn to scale). A putative ribosome binding site (RBS) upstream of 05SSU0241 is depicted by a small flag. The stem-loop structure represents a putative transcriptional terminator. B: Genomic organization of the *plcR* genes and the reference gene in *S. suis* 05ZYH33 (not drawn to scale). The location of the primer pairs used in RT-PCR analysis are indicated by inverted arrowheads. P05SSU0241 indicates 05SSU0241 and 05SSU0242 may be transcribed as a single operon. C: Electrophoresis of total RNA from the wild-type strain (lane 1) and the $\Delta plcR$ mutant (lane 2). Three bands are shown by the arrows, indicating the 23S rRNA, 16S rRNA, and 5S rRNA, respectively. The DL2000 marker is shown to the left (M). D: RT-PCR analysis of the *plcR* genes. The primer pairs used in the RT-PCR analysis are indicated above the lanes. cDNA from the wild-type strain (lanes 1, 3, 5, 7, 9), and cDNA from the $\Delta plcR$ mutant (lanes 2, 4, 6, 8, 10) were used as templates. The Gene Ruler Mix DNA ladder marker is shown to the left (M).

小也都没有明显差异，二者均长出圆形半透明、灰白色、表面光滑湿润的小菌落，直径约为 1-2 mm，且菌落周围能明显地观察到溶血环，直径约 2-3 mm，提示 *plcR* 基因与细菌的溶血性无直接关系。

2.5 动物实验结果

10⁷ CFU 野生株 05ZYH33 攻击小鼠后，小鼠临床表现为精神萎靡，皮毛杂乱倒逆，眼角有脓状分泌物，呈现出明显的 SS2 感染症状。如图 3 所示，野生株感染组 20 只小鼠 12 至 24 h 死亡 12 只，24-48 h 又死亡 2 只，48 h 内共死亡 14 只，之后不再死亡；而用相同剂量敲除株 $\Delta plcR$ 攻击小鼠，12 h 后死亡 8 只，24 h 后仍有 12 只存活，延至 48 h

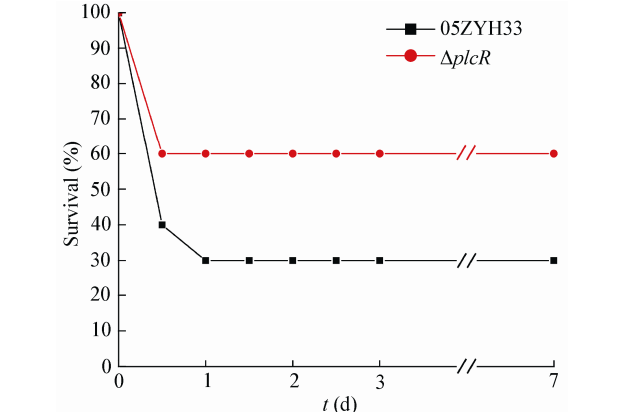


图 3 SS2 野生株 05ZYH33 和敲除株 $\Delta plcR$ 感染小鼠后的存活曲线
Figure 3 Survival curves of mice infected with the wild-type strain 05ZYH33 and the $\Delta plcR$ mutant

后,共死亡8只,存活12只;存活小鼠观察至7d实验结束时,均未发现有任何发病症状。统计学分析显示突变株感染组与野生株感染组的存活率有显著差异($P<0.05$),表明 *plcR* 基因与细菌的致病性相关。

3 讨论

目前,SS2引起人畜感染的具体致病机制仍不清楚,对于其毒力因子的研究一直是个热点,虽然已经发现了许多SS2的毒力因子,但是研究表明具有毒力因子的菌株并不一定致病,这提示我们,SS2可能是通过一些调控基因来调控毒力因子,使之协同发挥致病作用的。G+C%含量分析表明,在05ZYH33菌株中编号为05SSU0241和05SSU0242的基因编码序列G+C%含量只有35.2%,远低于全基因组的41.1%,表明这两个基因很可能是通过水平转移而获得的外源基因,且它们仅存在于SS2有毒株,在无毒株基因组中没有发现^[10]。通过生物信息学分析,发现这两个基因与芽胞杆菌属的*plcR*基因同源,因此推测它们也具有转录调控功能。

PlcR转录调控因子首先于芽胞杆菌属(包括蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌)中发现^[11],是一个主要的毒力调节因子,调控多种毒力因子的表达。然而目前PlcR在链球菌属中的作用未见相关的研究报道。生物信息学分析表明05ZYH33菌株的05SSU0241与蜡样芽胞杆菌的PlcR相似度为46%,而05SSU0242的相似度为28%,它们二者是否真实表达且为活性基因尚需实验证实。序列分析发现PlcR的同源物在肺炎链球菌(*S. pneumoniae*),嗜热链球菌(*S. thermophilus*),马链球菌(*S. equi*)等链球菌中普遍存在,这提示着PlcR转录调节因子在这些链球菌中也起作用,因此我们认为它也是一个候选的毒力调节因子。为了探讨PlcR因子在SS2致病过程中发挥的作用,本研究利用同源重组的方法构建了05ZYH33 *plcR* 基因敲除菌株。多重交叉PCR及RT-PCR结果显示,无论在基因水平还是转

录水平上均证实*plcR*基因被成功敲除。基本生物学性状比较实验显示,突变株的生长速率、菌落形态以及溶血活性等方面与野生株之间均无明显差异;小鼠致病实验结果说明突变株的毒力较野生株有显著下降,这提示我们PlcR确实参与了SS2的致病过程。但它是通过调节哪些基因的表达来发挥作用还需要进一步探究。

PlcR转录调控因子是芽胞杆菌属的一个主要毒力调节因子,对于胞外毒力因子具有多效调节作用。PlcR蛋白的表达受自身所调控,它的N端为较为保守的DNA结合区域,受PlcR转录调控因子调控的基因启动子区域都有一个PlcR box,即一段高度保守的回文序列TATGNAN4TNCATA,这段序列被认为是PlcR的识别位点^[19]。PlcR转录调控因子所调节的基因呈散落分布,多成对出现,共用同一个PlcR box,两基因呈反向排列^[20]。目前该基因在人机会致病菌蜡样芽胞杆菌及昆虫病原菌苏云金芽胞杆菌的致病机制中的作用研究得最多,本研究首次发现其与高致病性SS2的毒力也存在关联。由于之前研究显示,该转录调节因子可以通过激活多种编码毒力因子的基因表达,从而参与致病过程。因此我们下一步将以*plcR*基因缺失的突变株为研究对象,进行全基因组表达谱芯片实验,通过比较野生株与突变株基因表达的差异,找出受PlcR调控的基因,并希望在其中发现可能的致病相关基因,为进一步研究PlcR转录调控因子如何参与SS2致病过程,发现新的致病相关基因奠定基础。

参考文献

- [1] Feng Y, Zhang H, Ma Y, et al. Uncovering newly emerging variants of *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent[J]. Trends in Microbiology, 2010, 18(3): 124-131.
- [2] Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, et al. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen[J]. Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 2009, 48(5): 617-625.
- [3] Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America[J]. Animal Health Research Reviews/Conference of Research Workers in Animal

- Diseases, 2007, 8(1): 29-45.
- [4] Tang J, Wang C, Feng Y, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. PLoS Medicine, 2006, 3(8): e151.
- [5] Chabot-Roy G, Willson P, Segura M, et al. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils[J]. Microbial Pathogenesis, 2006, 41(1): 21-32.
- [6] de Greeff A, Buys H, Verhaar R, et al. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(3): 1319-1325.
- [7] Baums CG, Kaim U, Fulde M, et al. Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(11): 6154-6162.
- [8] Wu Z, Li M, Wang C, et al. Probing genomic diversity and evolution of *Streptococcus suis* serotype 2 by NimbleGen tiling arrays[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 219.
- [9] Lu G, Qi J, Gao F, et al. A novel "open-form" structure of sortaseC from *Streptococcus suis*[J]. Proteins, 2011, 79(9): 2764-2769.
- [10] de Greeff A, Buys H, van Alphen L, et al. Response regulator important in pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Microbial Pathogenesis, 2002, 33(4): 185-192.
- [11] Agaisse H, Gominet M, Okstad OA, et al. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*[J]. Molecular Microbiology, 1999, 32(5): 1043-1053.
- [12] Callegan MC, Kane ST, Cochran DC, et al. Relationship of *plcR*-regulated factors to *Bacillus endophthalmitis* virulence[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(6): 3116-3124.
- [13] Gohar M, Okstad OA, Gilois N, et al. Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon[J]. Proteomics, 2002, 2(6): 784-791.
- [14] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*[J]. Plasmid, 2001, 46(2): 140-148.
- [15] Smith HE, Wisselink HJ, Vecht U, et al. High-efficiency transformation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2[J]. Microbiology (Reading, England), 1995, 141 (Pt 1): 181-188.
- [16] Zhao Y, Liu G, Li S, et al. Role of a type IV-like secretion system of *Streptococcus suis* 2 in the development of streptococcal toxic shock syndrome[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2011, 204(2): 274-281.
- [17] Rohs R, Jin X, West SM, et al. Origins of specificity in protein-DNA recognition[J]. Annual Review of Biochemistry, 2010, 79: 233-269.
- [18] D'Andrea LD, Regan L. TPR proteins: the versatile helix[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2003, 28(12): 655-662.
- [19] Lereclus D, Agaisse H, Gominet M, et al. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(10): 2749-2756.
- [20] Okstad OA, Gominet M, Purnelle B, et al. Sequence analysis of three *Bacillus cereus* loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin[J]. Microbiology (Reading, England), 1999, 145(Pt 11): 3129-3138.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 我刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。