

## 高致病性 2 型猪链球菌截短型类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶基因的鉴定和功能研究

殷素鹏 赵岩 李明 陈恬 姚新月 钟秋 谭银玲 胡福泉\*

(第三军医大学 基础部微生物学教研室 重庆 400038)

**摘要:**【目的】克隆表达高致病性 2 型猪链球菌 05ZYH33 株的 *SspA* 截短型基因, 验证其是否具有酶学活性, 并构建该基因的缺失突变株细菌, 探讨其在 2 型猪链球菌致病过程中所起的作用。【方法】构建 SS2 的 *SspA* 截短型基因 *05SSU0811* 原核表达质粒, 表达并纯化 *05SSU0811* 蛋白, 运用丝氨酸蛋白酶底物 Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (pNa), 通过显色反应检测表达产物的酶学活性; 运用同源重组技术敲除 *05SSU0811* 基因, 多重交叉 PCR 筛选敲除株并测序鉴定, 动物试验分析 *05SSU0811* 基因缺失对细菌毒力的影响。【结果】成功表达并纯化 *05SSU0811* 蛋白, 浓度约为 3.5 g/L。丝氨酸蛋白酶活性测定试验证实其具有酶学活性; 获得 *05SSU0811* 基因缺失突变株, 小鼠攻毒试验表明, 野生株攻毒的 20 只小鼠全部死亡, 基因缺失突变株攻毒组死亡 9 只, 死亡率 45%, 两组间死亡率有显著性差异。表明 *05SSU0811* 基因缺失的菌株毒力较野生株明显下降。【结论】*05SSU0811* 基因编码的截短型丝氨酸蛋白酶仍然具有酶学活性, SS2 的截短型基因 *SspA* 在高致病性 2 型猪链球菌的致病性方面具有一定作用。

**关键词:** 2 型猪链球菌, 类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶, 细胞壁相关蛋白

## Identification and functional study of the truncated surface-associated subtilisin-like protease gene of *Streptococcus suis* serotype 2

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

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

**Abstract:** [Objective] To clone and express the truncated surface-associated subtilisin-like protease gene *05SSU0811* of *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) highly virulent strain 05ZYH33 and measure the activity of the recombinant protease; Construct the *05SSU0811* gene knockout mutant strain and analyze its contribution to pathogenicity. [Methods] The *05SSU0811* gene encoding *SspA* was amplified and cloned into the expression plasmid pET28a and then transformed

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 81301398); 全军医学科技青年培育项目(No. 13QNP106)

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

收稿日期: 2013-11-11; 接受日期: 2013-12-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-12-27

into *Escherichia coli* BL21 to overproduce the protein. The recombinant protease was purified by chromatography procedures. Its activity was measured by using the chromogenic substrate Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (pNa). The *05SSU0811* gene was replaced with spectinomycin resistance cassette through homologous recombination, then multiple-PCR and sequence analysis were adopted to identify the knockout strain  $\Delta 05SSU0811$ . The virulence of SS2 wild type and  $\Delta 05SSU0811$  mutant strain were then evaluated by calculating the survival rate of the infected mice. **[Results]** The recombinant SspA was expressed and purified. Its activity was demonstrated by the subtilisin-like protease assay. The isogenic mutant  $\Delta 05SSU0811$  was successfully constructed and the virulence of the  $\Delta 05SSU0811$  mutant strain was attenuated remarkably compared to the wild type strain. **[Conclusion]** The truncated SspA encoded by *05SSU0811* gene in SS2 exhibits its activity *in vitro*. And it also contributes to the virulence of SS2.

**Keywords:** *Streptococcus suis* serotype 2, Subtilisin-like protease, Surface-associated protein

丝氨酸蛋白酶是一类以丝氨酸为活性中心的蛋白水解酶，主要分为 6 个蛋白超家族，其中类胰蛋白酶和类枯草杆菌蛋白酶是其最主要的成员。类枯草杆菌蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶 S8 家族，广泛存在于细菌、真菌和寄生虫等病原生物中<sup>[1-3]</sup>。在细菌中，类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶 (Surface-associated subtilisin-like protease, SspA) 主要存在于革兰氏阳性菌，是重要的毒力因子。已报道类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶家族主要包含 3 个保守的催化活性位点基序：Motif I (Asp)，Motif II (His)和 Motif III (Ser)，这 3 个活性位点基序被认为是丝氨酸蛋白酶分类和发挥酶学活性的典型标志<sup>[4]</sup>。

2 型猪链球菌(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)是一种重要的人畜共患病病原体。SS2 不仅可以感染猪，引起急性脑膜炎、肺炎、关节炎、败血症等，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<sup>[5]</sup>。猪链球菌感染不仅给全世界养猪业造成巨大的经济损失，也对相关从业人员的健康构成了严重的威胁。近年来我国江苏和四川先后出现了两起大规模人感染 SS2 疫情，病人中出现重症链球菌中毒性休克综合征 (Streptococcal toxic shock syndrome, STSS)，病程凶险，致死率高，引发了严重的公共卫生事件<sup>[6]</sup>。

近年来，Laetitia Bonifait 以及胡巧云等一些研究结果表明 SspA 也参与 SS2 的致病过程<sup>[7-8]</sup>，

是一种重要的毒力因子。通过生物信息学分析，我们发现高致病性 SS2 05ZYH33 菌株基因组中的 *05SSU0811* 基因编码产物与类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶具有相似性。蛋白质结构分析表明，该蛋白与 SS2 国际标准株 P1/7 中 *SSU0757* 基因编码的 SspA<sup>[7]</sup>的 N 端 299 个氨基酸同源，含有 N 端的信号肽和两个催化活性位点基序，是一个截短的 SspA 蛋白。也就是说，国际标准株 P1/7 中的 *SSU0757* 在高致病性 SS2 中发生了突变。那么，这种突变是否会改变其致病性？只具有两个活性位点的丝氨酸蛋白酶是否仍然具有活性？为此，本研究通过分子生物学手段，克隆、诱导和表达得到了 *05SSU0811* 蛋白，并对其酶学活性进行了分析。此外，还构建了 *05SSU0811* 缺失突变株，观察敲除该基因后对 SS2 菌株毒力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒、引物、实验动物及培养方法

本试验所用的菌株、质粒及引物见表 1、2，引物由华大基因合成。BALB/c 品系小鼠购自本校实验动物中心，雌性，4-5 周龄(14-16 g)，SPF 级。SS2 培养于 THY 培养基，即含 2%酵母提取物的 Todd-Hewitt-Broth (THB)培养基<sup>[6]</sup>。大肠埃希氏菌培养于 LB 培养基。试验中所用抗生素浓度分别为：壮观霉素 100 mg/L，氨基青霉素 100 mg/L，四环素 10 mg/L，卡那霉素 50 mg/L。

## 1.2 生物信息学分析

运用美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)网站上的相似性比对工具(Basiclocal alignment search

tool, BLAST)对 05SSU0811 与 P1/7 SSU0757 蛋白的氨基酸序列进行相似性分析;利用 Expasy 网站上的 InterProScan 软件对上述蛋白的主要结构域进行分析。

表 1 本试验所用菌株和质粒  
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	Collected in our laboratory
<i>S. suis</i> $\Delta$ 05SSU0811	The deletion mutant of 05SSU0811 with background of 05ZYH33, Spc <sup>r</sup>	In this study
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Cloning host for maintaining the recombinant plasmids	TIANGEN
<i>E. coli</i> BL21	Expression host for overproducing the recombinant protein	TransGen
pUC18	Cloning vector; Amp <sup>r</sup>	Collected in our laboratory
pMD19-T	Cloning vector; Amp <sup>r</sup>	TaKaRa
pET28a	Expression vector; Kan <sup>r</sup>	Invitrogen
pSET4s	Thermosensitive suicide vector in <i>S. suis</i> ; Spc <sup>r</sup>	Collected in our laboratory
pUC18-LSR	A recombinant vector with the background of pUC18, designed for knockout of 05SSU0811; Amp <sup>r</sup> ; Spc <sup>r</sup>	In this study
pET28a-05SSU0811	A recombinant vector with the background of pET28a, designed for expression of 05SSU0811; Kan <sup>r</sup>	In this study

表 2 本试验所用引物  
Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primers	序列 Sequence of primers (5'→3')	酶切位点或重叠序列 Restriction sites or overlap
LA1	CCGGAATTCGGTAAGTCAAGGATTGTGAAAGG	<i>EcoR</i> I
LA2	CATGTATTCACGAACCTTCTTTCTTTTCATAACT	Overlap
RA1	CGCGGATCCGTTGTAAATGAATGAAAATGTGAC	<i>Bam</i> H I
RA2	ACGCGTCGACCCGTCTTCGCCAGTCAAATA	<i>Sal</i> I
Spc-F	TGAAAAAGAAAAGAAAGTTTCGTGAATACATGTTATAATA	Overlap
Spc-R	CGCGGATCCTTTCTAAAATCTGAT	<i>Bam</i> H I
in-F	GTCAGCGAATCAGCCTCA	
in-R	CAAGACAGTATTCACATCAACAT	
out-F	TTCCTATGTGATGATGGACCTTAA	
out-R	CCAGGAATCTCTGCTAATAGACACG	
05SSU0811-F	GGAATTCATATGGTGTCTGTTCTTTGGGTGC	<i>Nde</i> I
05SSU0811-R	CCCTCGAGTTTAAACAACAGAGCCGTTAGC	<i>Xho</i> I

### 1.3 05SSU0811 基因的克隆、表达及纯化

1.3.1 重组表达载体的构建：以 05ZYH33 的基因组 DNA 为模板，扩增 05SSU0811 基因序列，然后将其连接到 pET28a 载体的 *Nde* I/*Xho* I 多克隆位点，即为构建的重组表达质粒 pET28a-05SSU0811。

1.3.2 重组蛋白的诱导表达：将构建好的 pET28a-05SSU0811 重组质粒转化大肠杆菌 BL21，取培养过夜的转化菌按 1:100 比例接种于含 1% 葡萄糖的 LB 培养基中，培养至  $OD_{600}$  为 0.6 时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 30 °C 诱导过夜。

1.3.3 重组蛋白的纯化：将大量诱导表达的菌液离心后用 PBS 重悬，低温条件下超声碎菌，离心后取上清，利用 Ni-NTA 纯化系统纯化 His-05SSU0811 融合蛋白，取不同浓度咪唑的洗脱液行 SDS-PAGE 电泳，选取纯度最高的样本进行进一步的超滤浓缩，最后获得浓缩纯化的融合蛋白。Bradford 法测定纯化后蛋白的浓度。

1.3.4 重组蛋白质谱鉴定：重组蛋白送本校中心实验室做质谱鉴定。

### 1.4 05SSU0811 重组蛋白的酶学活性鉴定

取 100  $\mu$ L 浓度为 2 g/L 的重组蛋白(溶于 PBS, pH 8.0)加入浓度为 2 g/L 的丝氨酸蛋白酶显色底物 Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (pNa), 37 °C 反应 3 h, 最后通过酶标仪检测显色物质 pNa 在 415 nm 处的吸光度来反映其酶学活性<sup>[9]</sup>。

### 1.5 05SSU0811 基因敲除株的构建

1.5.1 敲除质粒的构建：以 05ZYH33 基因组为模板，分别扩增 05SSU0811 左右两侧约 1 000 bp 大小的同源片段。以质粒 pSET2 为模板，扩增壮观霉素抗性基因 *spc*，然后通过 Overlap PCR 和酶切连接将其依次连接到 pUC18 质粒中，形成一个 *spc* 基因两侧具有 05SSU0811 上下游同源臂的敲除质粒 pUC18-LA-SPC-RA<sup>[10]</sup>。

1.5.2 05SSU0811 敲除株的筛选鉴定：将 pUC18-LA-SPC-RA 敲除载体电转化 05ZYH33 野生株感受态<sup>[11]</sup>后涂于壮观霉素抗性的 THY 平板上，挑取平板上的单菌落用 05SSU0811 基因的内部引物

in-F/R 进行 PCR 初筛，再将筛选到的可疑突变菌株进行交叉 PCR 验证并将外部引物扩增的 PCR 产物送测序鉴定。

### 1.6 动物试验

分别挑取 05ZYH33 野生株和 05SSU0811 敲除株单菌落培养过夜，然后以 1:100 比例接种于 THY 培养基中，37 °C 静置培养至  $OD_{600}=1.0$  (约  $5.0 \times 10^8$  CFU/mL)，再用新鲜的培养基将菌液稀释 25 倍(浓度约为  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL)后各取 1 mL 菌液腹腔注射 BALB/c 小鼠，40 只小鼠随机分为两组，每组 20 只，密切观察动物感染后的体征，比较各组小鼠的发病情况及存活时间的差异，并进行统计学分析<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物信息学分析

通过氨基酸同源性比对分析发现，05ZYH33 株 05SSU0811 蛋白含有 299 个氨基酸。而 P1/7 菌株的 SSU0757 蛋白由 1 585 个氨基酸组成，包含了 N 端的信号肽，C 端的 G<sup>+</sup>菌细胞壁锚定基序 LPXTG 以及类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶家族典型的 3 个活性位点基序 Motif I (Asp)、Motif II (His) 和 Motif III (Ser)。而 05SSU0811 蛋白含有的 299 个氨基酸，覆盖了 P1/7 菌株的 SSU0757 蛋白的 26%，在覆盖区内一致性达到 100%，它包含了 N 端的信号肽和其中两个活性位点基序 Motif I (Asp) 和 Motif II (His)，故被确认为是一个截短的 SspA，它缺少了类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶 SspA 的 Motif III 区及其以后的氨基酸序列(图 1)。

### 2.2 05SSU0811 基因的克隆、表达及纯化

由于 05SSU0811 基因编码的截短型丝氨酸蛋白酶可能对宿主菌 BL21 有毒性，常规的诱导培养方法并不能获得大量表达的重组蛋白。通过多种条件的摸索，最终发现需在克隆菌株培养的初期，于培养基中加入 1% 的葡萄糖(抑制 LacZ 的本底表达)，培养至对数期后再加 IPTG 诱导才能获得重组表达的蛋白。SDS-PAGE 结果表明，通过 Ni-NTA 亲和纯化获得了一个分子量大小约为 55 kD 的融合

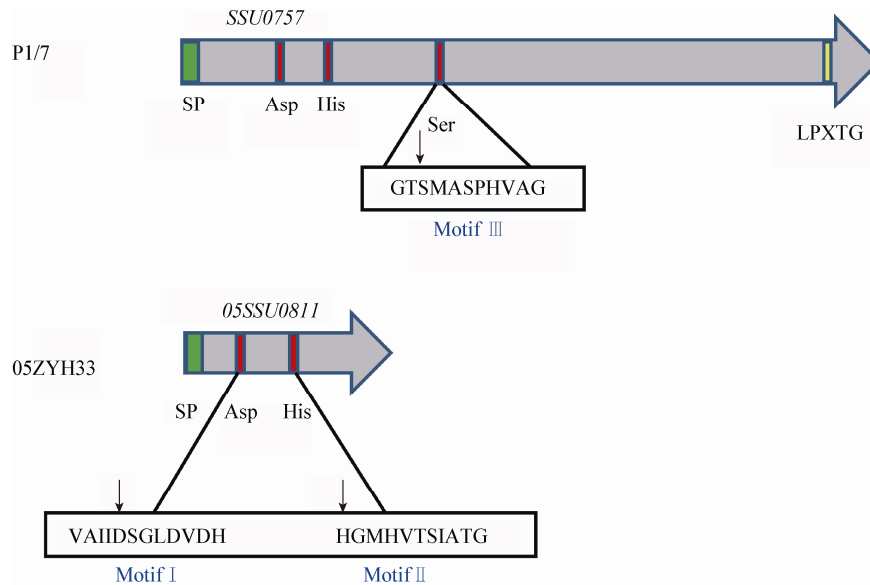


图 1 *SspA* 编码基因的生物信息学比对

Figure 1 Alignment of the gene encoding *SspA*

注：SP：信号肽；Asp, His, Ser：类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶催化活性位点；LPXTG：革兰阳性菌细胞壁锚定基序。

Note: SP: Signal peptide; Asp, His, Ser: The catalytic triad characteristic of subtilisin family proteinases; LPXTG: The Gram-positive cell wall anchoring motif.

蛋白(图 2)，但该蛋白理论分子量大小应为 32 kD 左右。为了确定该蛋白是否为需要的目的蛋白，对其进行了质谱鉴定，质谱结果表明该蛋白确为 05SSU0811。通过 Bradford 法测定纯化后的蛋白浓度约为 3.5 g/L。

### 2.3 重组蛋白的酶学活性鉴定

为了验证只有两个活性位点基序的 05SSU0811 是否具有丝氨酸蛋白酶活性，我们应用丝氨酸蛋白酶显色底物 pNa 对其进行了酶学活性鉴定，试验结果表明 05SSU0811 蛋白溶液与底物反应 3 h 后  $OD_{415}=0.59$ ，而阴性对照 PBS 溶液  $OD_{415}=0.18$ ，经统计学分析，两者具有显著性差异，说明 05SSU0811 仍然具有丝氨酸蛋白酶活性(图 3)。

### 2.4 05SSU0811 基因敲除株的构建

为了研究 05SSU0811 基因是否参与 SS2 毒力的构成，通过同源重组的方法(图 4A)获得了 05ZYH33 的 05SSU0811 基因敲除株。首先通过 05SSU0811 基因的内部引物 in-F/R 扩增对转化菌

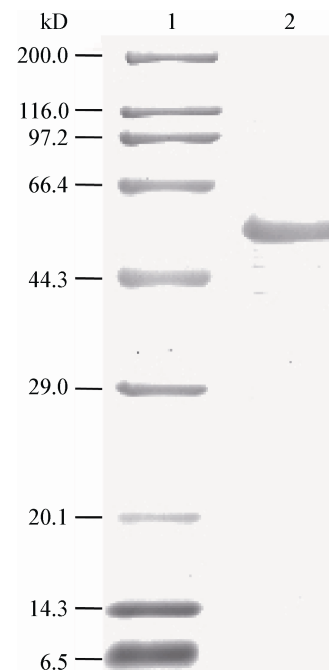


图 2 05SSU0811 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Figure 2 SDS-PAGE analysis with Coomassie blue staining of the recombinant 05SSU0811

注：1：蛋白质分子量标准；2：纯化的 05SSU0811 重组蛋白。

Note: 1: Molecular weight markers; 2: Purified recombinant 05SSU0811 protein.

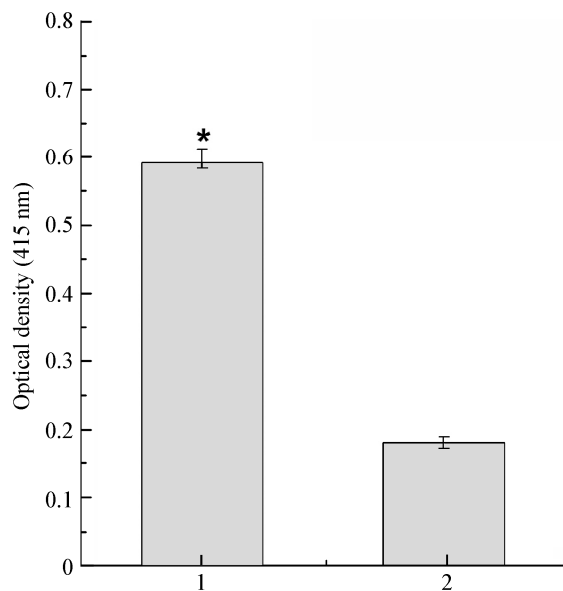


图 3 05SSU0811 重组蛋白丝氨酸蛋白酶活性测定

Figure 3 The activity of the recombinant 05SSU0811

注：1：重组蛋白 05SSU0811；2：阴性对照(PBS)。\*：05SSU0811 重组蛋白的丝氨酸蛋白酶活性与 PBS 阴性对照有显著差异 (\* $P < 0.05$ )。

Note: 1: Recombinant 05SSU0811; 2: Negative control (PBS). Asterisk indicates a significant difference between negative control and recombinant 05SSU0811 (\* $P < 0.05$ ).

进行了初筛，然后通过 7 对引物的多重 PCR 对初筛阳性的菌落进行了进一步的鉴定，多重 PCR 各对引物所扩增出的条带大小符合预期(图 4B)，表明 05SSU0811 基因已经成功被壮观霉素抗性基因 *spc* 所替代。外部引物 out-F/R 扩增产物测序后的结果同样显示 05SSU0811 基因敲除成功。

### 2.5 动物试验

如图 5 所示，用浓度为  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 的 05ZYH33 野生株和 05SSU0811 敲除株的菌液腹腔注射 BALB/c 小鼠，36 h 内，野生株组 20 只小鼠全部死亡，敲除株组死亡 9 只，死亡率 45%，其余小鼠在观察至 7 d 实验结束时均未再死亡，也无明显发病症状和体征。统计学分析结果表明两组小鼠存活率有显著差异  $P < 0.01$ ，有统计学意义。说明 05SSU0811 基因参与 05ZYH33 株毒力的构成。

### 3 讨论

类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶(SspA)是革兰氏阳性细菌的一种重要的毒力因子。近几年，有关 SspA 在 SS2 致病方面的作用亦有研究报道。例如，研究表明，在 SS2 的 SC19 菌株和国际标准株 P1/7 株中，SspA 编码基因的缺失导致感染仔猪或小鼠的致死率明显降低<sup>[7-8]</sup>，说明 SspA 与 SS2 的毒力相关；此外，研究发现，在 P1/7 中，重组表达的 SspA 不仅能够体外刺激巨噬细胞大量分泌 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CXCL8、CCL5 等炎症因子和趋化因子，在较高剂量下还能降解 CCL5 趋化因子<sup>[13]</sup>，说明 SspA 可能通过诱导和调节机体的炎症反应参与细菌的致病过程。我们通过生物信息学分析发现，高致病性 SS2 05ZYH33 基因组中的 05SSU0811 基因编码一个截短的 SspA 蛋白，它只含有类枯草杆菌蛋白酶家族 3 个保守活性位点基序中的两个。那么，这种突变会不会改变其致病性？只具有两个活性位点的丝氨酸蛋白酶是否仍然具有活性？

为此，我们对 05SSU0811 这个 *SspA* 的截短型基因进行了克隆和外源表达，并通过镍亲和层析的方法，获得了纯度较高的蛋白。然后用丝氨酸蛋白酶底物 pNa 对其酶学活性进行了验证，首次证实了只具有两个活性位点基序的类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶(05SSU0811)仍然具有酶学活性。但从文献报道来看<sup>[7,9]</sup>，与 SspA 全酶相比，截短型 SspA 的酶学活性有所降低。但由于实验结果来源于两个不同的实验室，两者之间可能并不具有可比性。此外，为了证实该截短型基因是否对 SS2 菌株的毒性确有贡献，通过同源重组的方法，构建了 05SSU0811 基因缺失的突变株，以 BALB/c 小鼠为模型，进行了攻毒试验。结果表明，突变株攻毒组小鼠死亡率较野生株组明显降低，说明只具有两个活性位点基序的类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶(05SSU0811)仍具有致病性。由于完全型 SspA 蛋白的 C 末端具有 G<sup>+</sup>菌细胞壁锚定基序 LPXTG，说明作为毒力因子的 SspA 蛋白可能表达在 G<sup>+</sup>菌细胞的细胞表面而

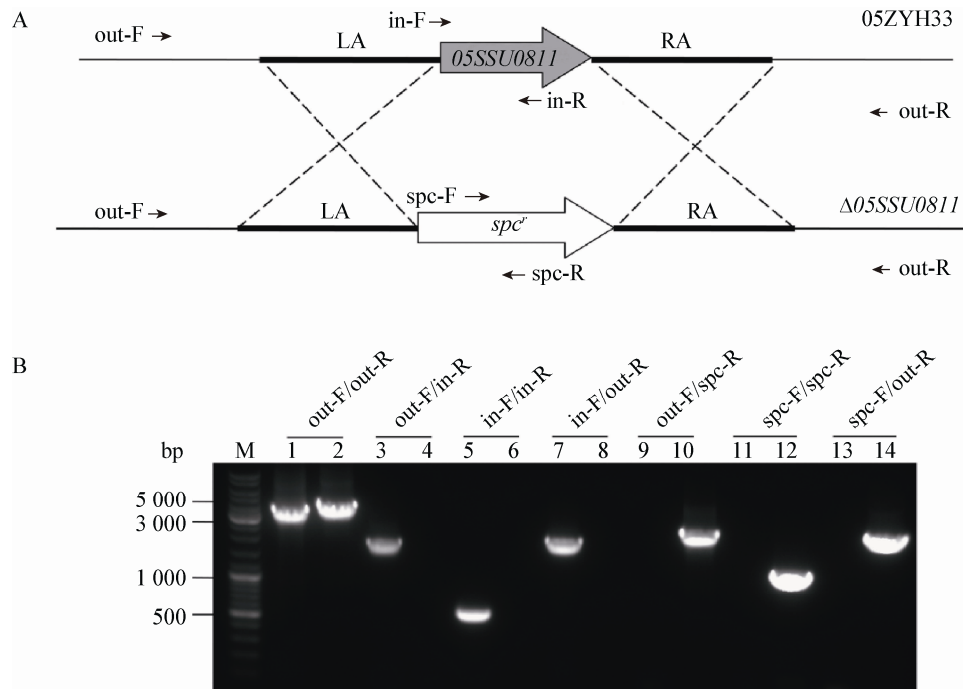


图 4 *05SSU0811* 缺失突变株的构建及鉴定

Figure 4 Construction and confirmation analysis of the knockout mutant strain  $\Delta 05SSU0811$

注: A: *05SSU0811* 基因敲除策略: 同源重组后 *05SSU0811* 基因被壮观霉素基因(*spc*)替换; B:  $\Delta 05SSU0811$  基因敲除突变株多重 PCR 验证, 所用引物标注于各泳道上方, 单数泳道(1, 3, 5, 7, 9, 11, 13)所用模板为野生株 05ZYH33 基因组 DNA, 双数泳道(2, 4, 6, 8, 10, 12, 14)所用模板为突变株  $\Delta 05SSU0811$  基因组 DNA. M: DNA marker.

Note: A: Strategy for deletion mutagenesis of *05SSU0811* by allelic replacement with a spectinomycin resistance cassette (*spc*); B: Confirmatory PCRs of the  $\Delta 05SSU0811$  mutant. The primer pairs used in the multiple-PCR analysis are indicated above the lanes. Genomic DNAs from the wild-type strain 05ZYH33 strain (lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13) and the mutant  $\Delta 05SSU0811$  (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).

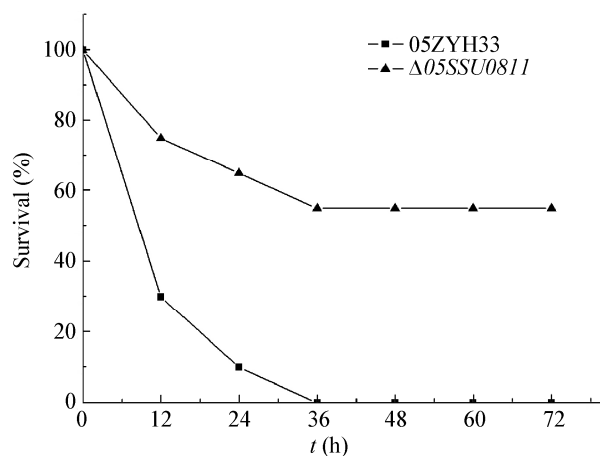


图 5 SS2 野生株 05ZYH33、敲除株  $\Delta 05SSU0811$  感染小鼠后的存活曲线

Figure 5 Survival curves of mice infected with indicated SS2 strains

发挥毒性作用。而本研究结果表明, 缺乏 C 端 Motif III 区及其锚定基序的截短型蛋白仍然具有酶学活性, 高度提示该截短蛋白有可能通过分泌蛋白的形式分泌到胞外发挥其毒性作用。这丰富了我们对于类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶致病性的认识, 将有助于阐明高致病性 SS2 的致病机制。但其究竟通过何种途径参与致病, 本课题组还在对其具体的致病机制进行深入研究。

## 参考文献

- [1] Ghasemi Y, Dabbagh F, Ghasemian A. Cloning of a fibrinolytic enzyme (subtilisin) gene from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*[J]. Molecular Biotechnology, 2012, 52: 1-7.

- [2] Muszewska A, Taylor JW, Szczesny P, et al. Independent subtilases expansions in fungi associated with animals[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28: 3395-3404.
- [3] Poole CB, Jin J, McReynolds LA. Subtilisin-like proteases in nematodes[J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2007, 155: 1-8.
- [4] Siezen RJ, Leunissen JA. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 1997, 6: 501-523.
- [5] 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: 617-625.
- [6] Tang J, Wang C, Feng Y, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *PLoS Medicine*, 2006, 3: e151.
- [7] Bonifait L, de la Cruz Dominguez-Punaro M, Vaillancourt K, et al. The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for *Streptococcus suis*[J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 42.
- [8] Hu Q, Liu P, Yu Z, et al. Identification of a cell wall-associated subtilisin-like serine protease involved in the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2010, 48: 103-109.
- [9] Bonifait L, Vaillancourt K, Gottschalk M, et al. Purification and characterization of the subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* that contributes to its virulence[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 148: 333-340.
- [10] Li M, Wang C, Feng Y, et al. Salk/SalR, a two-component signal transduction system, is essential for full virulence of highly invasive *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *PLoS One*, 2008, 3: e2080.
- [11] 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.
- [12] 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: 274-281.
- [13] Bonifait L, Grenier D. The SspA subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* triggers a pro-inflammatory response in macrophages through a non-proteolytic mechanism[J]. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 47.