

## 外源糖原调控猪链球菌基因表达的转录组分析

谭美芳<sup>1</sup>, 李海琴<sup>1</sup>, 曾艳兵<sup>1</sup>, 张帆帆<sup>1</sup>, 杨群<sup>1</sup>, 谭佳<sup>1</sup>, 方绍培<sup>1</sup>, 吴诚诚<sup>1</sup>, 饶煜玲<sup>1</sup>, 周锐<sup>\*2</sup>

1 江西省农业科学院畜牧兽医研究所, 江西 南昌 330200

2 华中农业大学动物医学院 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070

谭美芳, 李海琴, 曾艳兵, 张帆帆, 杨群, 谭佳, 方绍培, 吴诚诚, 饶煜玲, 周锐. 外源糖原调控猪链球菌基因表达的转录组分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1690-1704

Tan Meifang, Li Haiqin, Zeng Yanbing, Zhang Fanfan, Yang Qun, Tan Jia, Fang Shaopei, Wu Chengcheng, Rao Yuling, Zhou Rui. Transcriptome analysis of exogenous glycogen availability regulating gene expression of *Streptococcus suis*[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1690-1704

**摘要:**【背景】碳水化合物的利用与猪链球菌在宿主体内的定殖和致病性密切相关。感染期间, 宿主细胞释放的糖原可能是猪链球菌重要的碳源。【目的】从转录组学角度解析猪链球菌全基因转录水平对外源糖原诱导的响应, 特别是毒力基因。【方法】将猪链球菌 2 型强毒株分别用糖原和葡萄糖进行液体培养, 通过高通量转录组测序, 比较分析糖原对猪链球菌代谢通路和毒力基因差异表达的影响, 并通过体外试验和攻毒试验进行验证。【结果】猪链球菌在糖原培养基中生长良好。转录组数据显示, 糖原培养条件下的猪链球菌共有 908 个基因差异表达, 基因组占比 46.07%, 其中 501 个基因上调表达, 407 个基因下调表达。富集分析结果表明, 糖原影响了猪链球菌广泛的基础代谢过程, 但糖酵解途径保持稳定。30 个毒力基因的表达水平发生变化, 重要的毒力因子 SLY、ApuA、ArcABC 等的基因转录水平大幅度升高(倍数>20)。糖原培养后的猪链球菌的溶血活性、黏附和侵入能力显著上升, 对受试动物的毒力增强, 证实猪链球菌能够响应糖原诱导, 糖原能调控猪链球菌的致病性。【结论】外源糖原的利用显著影响了猪链球菌的基因表达谱, 这种对碳源的响应是细菌对不断变化的生存环境的适应性, 也反映了细菌对碳水化合物的利用与其致病性之间的紧密联系。

**关键词:** 猪链球菌; 碳水化合物; 糖原; 转录组; 毒力基因

基金项目: 国家自然科学基金(31960713); 国家重点研发计划(2017YFD0500201)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31960713); National Key Research and Development Program of China (2017YFD0500201)

\*Corresponding author: E-mail: rzhou@mail.hzau.edu.cn

Received: 2021-09-14; Accepted: 2021-10-07; Published online: 2021-12-20

## Transcriptome analysis of exogenous glycogen availability regulating gene expression of *Streptococcus suis*

TAN Meifang<sup>1</sup>, LI Haiqin<sup>1</sup>, ZENG Yanbing<sup>1</sup>, ZHANG Fanfan<sup>1</sup>, YANG Qun<sup>1</sup>, TAN Jia<sup>1</sup>, FANG Shaopei<sup>1</sup>, WU Chengcheng<sup>1</sup>, RAO Yuling<sup>1</sup>, ZHOU Rui<sup>\*2</sup>

1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, Jiangxi, China

2 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

**Abstract:** [Background] Carbohydrate is closely related to the colonization and pathogenicity of *Streptococcus suis* in hosts, and the glycogen released from host cells may be an important carbon source of *S. suis*. [Objective] This paper aims to analyze the effect of exogenous glycogen on the transcriptome response of *S. suis*, especially the virulence genes. [Methods] The virulent *S. suis* type 2 SC19 strain was cultured in the glycogen and glucose medium, respectively. Through high-throughput transcriptome sequencing, the effect of glycogen on the metabolic pathways and virulence genes of *S. suis* were identified and analyzed, followed by verification through *in vitro* experiment and challenge test. [Results] *S. suis* grew well in the medium containing glycogen as the carbon source. Transcriptome data showed 908 (46.07% of the whole genome) differentially expressed genes under the glycogen culture condition, with 501 up-regulated and 407 down-regulated. Enrichment analysis revealed that glycogen affected a wide range of basic metabolic pathways in *S. suis*, but the glycolysis pathway remained stable. The expression levels of 30 virulence genes significantly changed. In particular, a series of known and important virulence factors, such as SLY, ApuA, and ArcABC, were highly up-regulated (fold change>20). Moreover, results showed that the hemolytic activity, adhesion, and invasion of *S. suis* cultured in glycogen significantly enhanced, and that its virulence to the tested animal model predictably increased. Thus, it was confirmed that *S. suis* responded to glycogen and glycogen regulated the pathogenicity of *S. suis*. [Conclusion] Exogenous glycogen significantly affected the genome expression profile of *S. suis*. Such response to the carbon source suggests the adaptability of the bacteria to the changing habitats and the close relationship between the carbohydrate and *S. suis* pathogenicity.

**Keywords:** *Streptococcus suis*; carbohydrate; glycogen; transcriptome; virulence gene

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种具有荚膜的革兰氏阳性椭圆球菌, 作为条件性致病菌, 其自然定殖部位主要位于猪的上呼吸道, 特别是鼻腔和扁桃体, 也包括消化道和生殖道。感染猪、康复猪或健康猪均可携带病原体, 病原可通过呼吸道传播, 常引起断奶仔猪或育肥猪呼吸困难、发绀或消减等症状, 病程发展严重后, 以脑膜炎、肺炎、关节炎、败血症等为主

要临床特征, 给全球养猪业造成了重大的危害和经济损失<sup>[1]</sup>。猪链球菌也是重要的人畜共患病病原菌, 能通过伤口或消化道感染人类, 导致脑膜炎、心内膜炎、化脓性关节炎或中毒性休克综合征等, 危害公共健康<sup>[2]</sup>。

碳水化合物的利用与病原菌的致病性密切相关。病原菌进化出一些机制来适应生长环境(温度、盐浓度、氧气、营养素等)的不断变化,

对可用碳源的适应性机制是其中的重要方面, 碳源是细菌对复杂环境做出适应反应的信号之一<sup>[3]</sup>。碳水化合物可为细菌提供所需的能量和元素, 是所有异养型细菌必须从外界摄取的营养物质, 以保证其生命活动和生长繁殖。对于病原菌来说, 能够适应和感受宿主体内不同的环境, 并从中获取和利用碳水化合物, 是其生存和繁殖进而损伤宿主机体的前提<sup>[3]</sup>。某种特定碳源的出现使细菌感受到正处于感染相关的机体组织或细胞中, 从而促使或抑制相关的毒力基因表达<sup>[4]</sup>。

研究表明, 猪链球菌在宿主口咽腔和食道的黏膜表面定殖时, 可利用宿主口咽腔内丰富的淀粉及其降解产物作为碳源, 并在此微环境中与宿主的免疫系统之间维持动态平衡关系, 菌群之间或细菌内部的营养竞争决定菌群是否能稳定定殖<sup>[5]</sup>。平衡被打破时, 猪链球菌干扰宿主黏膜的免疫系统, 突破上皮细胞屏障, 引起疾病的产生。Ferrando 等模拟猪链球菌在猪上呼吸道中所处的高丰度淀粉和低含量葡萄糖环境, 用含淀粉和葡萄糖的单糖培养基分别培养猪链球菌, 并进行转录组分析, 发现用淀粉培养过后的猪链球菌对猪喉上皮细胞的黏附和侵入能力增强, 相关毒力基因的表达量大幅上调, 说明猪链球菌对  $\alpha$ -葡聚糖的代谢与猪链球菌侵入宿主的生理过程紧密关联<sup>[4]</sup>。

随着病程发展, 猪链球菌侵袭血管内皮细胞间隙, 并在血液中存活、增殖, 侵入组织器官, 最终突破血脑屏障, 到达中枢神经系统<sup>[5]</sup>。在宿主血液中有较高丰度的葡萄糖, 但葡萄糖在其他组织器官中较为缺乏。据推测, 在感染期间, 损害或死亡细胞释放出的动物糖原是猪链球菌重要的碳源<sup>[4]</sup>。糖原是一个球形的、高度分支化的聚合物, 是人和动物体内主要的葡萄糖储存形式。糖原主要存在于肝脏和骨骼肌,

在哺乳动物的大脑中也有储存, 而且糖原浓度可高达  $10 \mu\text{mol/g}$ <sup>[6]</sup>。另外, CD1 小鼠<sup>[7]</sup>和巴马小型猪<sup>[8]</sup>的感染模型结果显示, 猪链球菌入侵宿主脑部、定殖并导致病理损伤的区域均有含量较丰富的脑糖原存在, 提示猪链球菌在宿主脑部的定殖与糖原分布具有空间关联性, 但是目前尚无猪链球菌响应糖原利用的相关数据报道。本研究利用转录组测序技术, 从碳源利用的角度分析外源糖原对猪链球菌转录组的影响, 以期揭示碳源代谢与猪链球菌致病性间的关联积累数据, 也为深入研究猪链球菌在致病过程中与宿主间动态的相互作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

猪链球菌 2 型强毒株 SC19 于 2005 年分离自四川省猪链球菌疫区的感染猪只<sup>[9]</sup>, 由华中农业大学动物医学院农业微生物学国家重点实验室保藏。

#### 1.1.2 培养基

胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)和胰蛋白胨大豆肉汤(TSB), BD Difco 公司。

Ferrando 等通过一系列生长试验证实, 猪链球菌菌株在不添加额外碳源的复合培养基(complex medium, CM)中生长不良, 培养 13 h 后仍维持在低密度( $OD_{600}$  为 0.25–0.30), 因此可作为猪链球菌生长实验的基础培养基<sup>[4,10]</sup>。CM 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.00, 胰化酪蛋白胨 5.00, 酵母提取物 5.00, 氯化钾 2.50, 尿素 0.06, 精氨酸 0.17, pH 7.0。按 1:100 的质量体积比添加葡萄糖或糖原的 CM 培养基用来培养猪链球菌菌株。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

Trizol Total RNA Extraction Kit, Invitrogen

公司; PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 宝生物工程(大连)有限公司; AceQ qPCR SYBR Green Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 蛋白胨、酵母提取物, BD Difco 公司; 新生牛血清(无噬菌体低内毒素), 杭州四季青生物工程材料有限公司; 无菌脱纤维绵羊血, 青岛海博生物技术有限公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清, Gibco 公司; 其余生化试剂, 生工生物工程(上海)股份有限公司。生化培养箱, 上海博讯实业有限公司; 台式高速冷冻离心机, 力康生物医疗科技控股有限公司; 核酸蛋白测定仪, Eppendorf 公司; 荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司。

## 1.2 生长曲线测定

将保藏的 SC19 菌种划线接种于含 5% 新生牛血清的 TSA 固体培养基平板上, 37 °C 恒温静置培养 12 h; 挑取单菌落转接于含 5% 新生牛血清的 TSB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜; 将菌液于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 分别用等量的 CM 培养基、含 1% 葡萄糖的 CM 培养基(CM+Glu)和含 1% 糖原的 CM 培养基(CM+Gly)洗涤菌体, 重复 3 次; 以 1:100 的体积比分别转接至对应的 CM 培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养, 每隔 1 h 取样, 在 600 nm 波长条件下测定菌体的吸光度值( $OD_{600}$ )。

## 1.3 转录组测序(RNA-Seq)

按照 1.2 所述的培养条件, 将 SC19 菌株分别接种于 CM+Glu 和 CM+Gly 培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养至对数生长期( $OD_{600}$  约为 0.5), 将菌液于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体进行转录组测序。菌体样品经过 RNA 抽提、纯化、建库之后, 基于 Illumina HiSeq 测序平台对文库进行双末端测序。使用 FASTQ 格式保存原始数据, 采用 FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) 对

下机数据进行质量检测和数据过滤。通过 Bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) 建立参考基因组索引, 将质控分析后的高质量测序数据比对到猪链球菌参考基因组 (GenBank 登录号为 GCF\_000026725.1) 上。

## 1.4 差异表达基因分析

通过 HTSeq 0.6.1p2 软件 (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq>) 对各样品进行基因表达水平定量分析, 然后采用 DESeq (V1.18.0) 对基因表达进行差异分析, 筛选差异表达基因条件为: 表达倍数差异  $\text{Log}_2|\text{fold change}| > 1$ , 显著性  $P < 0.05$ 。采用 R 语言 ggplots2 软件包绘制差异表达基因的火山图。

## 1.5 聚类分析

根据筛选获得的各组的差异表达基因, 使用 R 语言 Pheatmap 软件包对基因和样品进行双向聚类分析。采用 Euclidean 方法计算距离, 层次聚类最长距离法进行聚类。利用 WEGO 软件 (<http://wego.genomics.org.cn>) 将所有差异基因映射到 Gene Ontology (GO) 数据库的各个条目, 计算每个条目的差异基因数目, 并以整个基因组为背景, 采用超几何分布计算差异基因显著富集的条目。最后根据 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 数据库, 统计各个 KEGG pathway 不同层级上包含的差异表达基因数目, 进而确定差异表达基因主要参与的代谢途径和信号通路; 并以整个基因组为背景, 采用超几何分布计算差异基因显著富集的通路。

## 1.6 差异表达基因验证

采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 的方法检测所选 10 个基因的转录水平, 验证转录组数据的可靠性。根据 NCBI 公布的猪链球菌全基因组序列设计 RT-qPCR 特异性引物(表 1), 引物委托深圳华大基因科技有限公司合成。按照 cDNA 合

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物

Table 1 Primers used for RT-qPCR assays

基因编号	基因名称	上游引物序列	下游引物序列
Gene code	Gene name	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
SSUSC84_0249	<i>adhP</i>	CCAGCTCAAGCAAGTTCTATC	GCAAGGTTTCCAAGTCCA
SSUSC84_1871	<i>apuA</i>	ATCGGTGGAGGTCTTGTG	CTGCCTTGATACGCTCTGT
SSUSC84_1262		AAACTCAATCCAGGTGTTCC	GTTCCCAAACCTTCTTCTCCA
SSUSC84_0917	<i>glgD</i>	ATGGCGTGACAATCAAGAG	TCAAGTATGAAGGCGAAGTTT
SSUSC84_0270	<i>dnaJ</i>	CTCGTCAAGGGGATGATTT	GTTTGGCACCTGAACCTG
SSUSC84_1724	<i>msmK</i>	GAGATGGTTTCAAGGTGGAG	CGATGGAAGATGGATAAGTGT
SSUSC84_0015	<i>ftsH</i>	AATGTTTGTGGTGTCCGT	GAGTTGGTTGAGGGTTTGT
SSUSC84_1959	<i>gidA</i>	GCCAAACCACTTTTCATTCT	CTGTATTGCGACCTTCTGG
SSUSC84_0671	<i>mrp</i>	ATCACGCTATGTTCTTGTTC	CATTGTTCCTGGTGTCTGT
SSUSC84_0092	<i>rpmJ</i>	GAAAGTAAAGACCATCGGTCAA	GGGCAAATCACCATAACAC
SSUSC84_0376	<i>cysK</i>	AAAATGGCTGGGTTCCTT	CTGCCGAAATACCTTGGA
SSUSC84_1079	<i>citZ</i>	TGTTGTTGGCTATTCGTGAG	CGCTTCATCGTCTGTTCC
SSUSC84_r0001	16S rRNA	ACTCCTACGGGAGGCAGCA	ATTACCGCGGCTGCTGG

成试剂盒说明书, 将经过检测合格并定量的总 RNA 逆转录成 cDNA。RT-qPCR 反应体系 (20  $\mu$ L): 2 $\times$ SYBR Real-Time PCR Premixture 10  $\mu$ L, PCR 特异性上、下游引物(10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L, RNase free ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。以 16S rRNA 基因作为内参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  分析方法<sup>[11]</sup>计算目的基因的 mRNA 相对表达量。

### 1.7 溶血试验

将 SC19 菌株分别接种于 CM+Glu 和 CM+Gly 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养至对数生长期( $OD_{600}$  约为 0.6), 各取 1 mL 培养液, 于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清 100  $\mu$ L 到 96 孔微孔板中, 每个样品设置 5 个重复。用生理盐水洗涤羊红细胞, 配制成 2% 红细胞悬液, 取 100  $\mu$ L 加入到上清中, 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h。反应后的微孔板在 2 000 r/min 条件下离心 10 min, 使未被裂解的红细胞沉淀至孔底。取 100  $\mu$ L 上清液到新的 96 孔微孔板中, 在 550 nm 波长条件下测定液体的吸光度值。不含细菌的干净培养基作为阴性对照。

### 1.8 黏附与侵入试验

将 SC19 菌株分别接种于 CM+Glu 和 CM+Gly 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养至对数生长期( $OD_{600}$  约为 0.5), 用无抗生素无血清的 DMEM 高糖培养基洗涤、重悬菌体, 将菌体浓度调整至  $1 \times 10^6$  CFU/mL。另将新生猪气管上皮细胞(NPTr)接种于 12 孔细胞培养板中, 使细胞数约  $1 \times 10^5$  个/孔, 待细胞贴壁后, 弃去原细胞培养液, 每孔加入 1 mL 上述菌悬液, 于 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h。然后弃去上清液, 用无菌 PBS 洗涤细胞 3 次, 每孔加入 1 mL 无菌 ddH<sub>2</sub>O 裂解细胞。将细胞裂解液梯度稀释后涂布在 TSA 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 以计算侵入细胞内和黏附于细胞表面的细菌总数。为获得侵入细胞内的细菌菌数, 在细胞和细菌作用 2 h 后, 用无菌 PBS 洗涤细胞, 每孔加入终浓度为 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 DMEM 培养液, 37  $^{\circ}$ C 杀菌 2 h, 再用无菌 ddH<sub>2</sub>O 裂解细胞, 进行培养计数。每个组设置 3 个样品重复。

### 1.9 攻毒试验

蜡虫(*Galleria mellonella*)作为致病菌感染动物模型, 具有简单、经济、高效等优点, 允

许在宿主体温(37 °C)条件下进行实验, 并可减少脊椎实验动物的使用数量。当前, 蜡虫已被用于多种病原微生物的研究, 如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、A 群链球菌和猪链球菌等<sup>[12]</sup>。因此, 本研究选择蜡虫作为猪链球菌感染模型。接种用的 60 只蜡虫重量在 0.55–0.65 g 之间, 随机分成 6 组, 每组 10 只。将 SC19 菌株接种于 CM+Glu 和 CM+Gly 培养基中, 于 37 °C、180 r/min 条件下振荡培养至对数生长期( $OD_{600}$  约为 0.5), 于 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用无菌生理盐水洗涤菌体, 并用无菌生理盐水将细菌浓度调整至  $OD_{600}$  为 0.1, 作为高剂量接种液(high dose)。继续使用无菌生理盐水将菌体稀释 10 倍后作为低剂量接种液(low dose)。在高剂量组和低剂量组中, 使用在 100 °C 下灭活 30 min 的细菌接种物作为阴性对照。每组蠕虫用胰岛素注射器分别从左下足注射 20  $\mu$ L 接种液。各组蠕虫放在 9 cm 无菌塑料平皿中, 于 37 °C 恒温箱中无食物培养 7 d, 记录存活情况, 绘制生存曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 生长实验结果

为测定猪链球菌是否能利用外源糖原作为碳源, 采用含 1%糖原和 1%葡萄糖的 CM 培养基培养猪链球菌 SC19 菌株, 同时用 CM 培养基培养 SC19 作为阴性对照。结果显示(图 1), SC19 能够在糖原培养基中生长, 而且在对数前期与葡萄糖培养的菌株生长曲线一致; 在对数生长后期, 糖原培养的 SC19 的  $OD_{600}$  值高于葡萄糖培养的菌株, 说明猪链球菌在糖原为碳源的培养基中能够生长良好。

### 2.2 差异表达基因分析结果

为了探究外源糖原对猪链球菌基因转录组的影响, 用 CM+Glu 和 CM+Gly 培养基分别培养

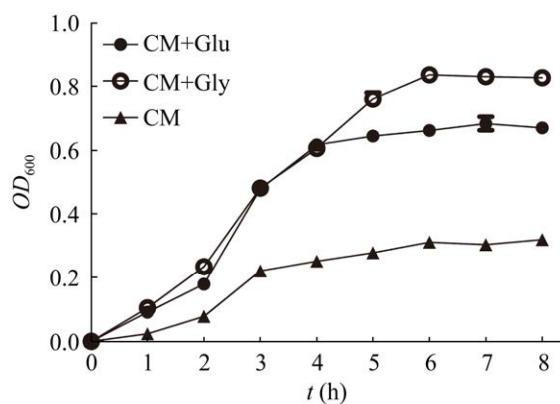


图 1 猪链球菌 SC19 在不同碳源培养条件下的生长曲线

Figure 1 Growth curves of *Streptococcus suis* in different carbohydrates.

SC19, 每组设置 3 个重复, 取对数生长期的细菌提取 RNA, 然后进行转录组测序。将过滤后的 6 个转录组数据分别使用 Bowtie2 软件映射到猪链球菌 SC84 基因组, 所有样品均可映射到基因组上, 而且映射率均大于 97%, 这表明菌株 SC19 的转录组数据可靠, 可用于后续分析。

比对 2 种培养条件下 SC19 的转录组数据, 筛选差异表达基因, 绘制火山图, 结果如图 2 所示。通过本次转录组测序, 共筛选到 908 个差异表达基因, 在全基因组中占比 46.07%, 其中 501 个上调表达, 407 个下调表达。

### 2.3 差异表达基因的 GO 富集分析结果

对获得的差异表达基因进行 GO 注释分析, 共得到 696 个 GO 功能注释, 其中生物学过程 (biological process) 425 个、细胞组分 (cellular component) 37 个和分子功能 (molecular function) 234 个。如图 3 所示, 差异基因属于生物过程分类的主要有代谢过程 (metabolic process)、有机物代谢过程 (organic substance metabolic process)、初级代谢过程 (primary metabolic process) 和细胞过程 (cellular process) 等, 属于细胞组分分类的主要有细胞 (cell)、细胞部分 (cell



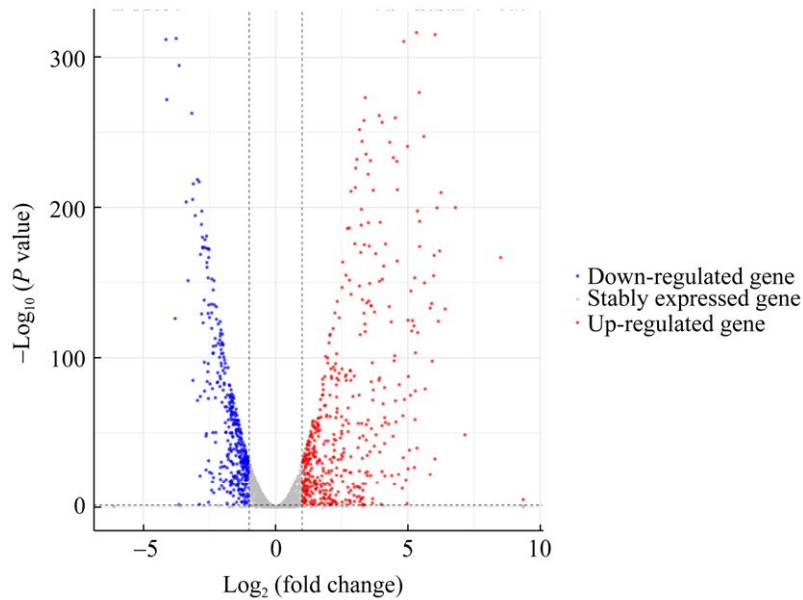


图 2 差异表达基因火山图 每一个点代表一个基因，红色表示上调表达的基因，蓝色表示下调表达的基因，灰色表示非显著差异表达基因。竖虚线为 2 倍表达差异阈值；横虚线为  $P=0.05$  阈值

Figure 2 Volcano plot of differentially expressed genes. Each dot represents a single gene. Red dots represent the up-regulated genes; Blue dots represent the down-regulated genes; Gray dots represent stably expressed genes. The vertical dotted lines in the histogram indicate the 2-fold gene expression threshold; The horizontal dotted line indicates the  $P=0.05$  threshold.

part)、膜(membrane)和胞内(intracellular)等,属于分子功能分类的主要有催化活性(catalytic activity)、结合(binding)、有机环化物结合(organic cyclic compound binding)和杂环化合物结合(heterocyclic compound binding)等。从 GO 富集分析结果可以看出,差异表达基因在三类功能注释中均未显著富集(图 3),表明外源糖原的利用不仅影响了碳水化合物的代谢,还影响了猪链球菌广泛的基础代谢过程和应激生存信号通路。

#### 2.4 差异表达基因的 KEGG 富集分析结果

进一步将差异表达基因进行 KEGG 富集分析,发现差异表达基因富集于 131 个 KEGG 代谢途径中。富集程度最高的 KEGG 代谢途径主要包括磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)、淀粉和蔗糖代谢(starch and sucrose

metabolism)、核糖体(ribosome)、半乳糖代谢(galactose metabolism)及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成(valine, leucine and isoleucine biosynthesis)等;而包含了最多差异表达基因的 KEGG 代谢途径主要包括 ABC 转运子[ATP binding cassette (ABC) transporters]、核糖体、磷酸转移酶系统、淀粉和蔗糖代谢、嘌呤代谢(purine metabolism)等(图 4)。其中,差异基因上调表达比例最高的代谢途径有半乳糖代谢(galactose metabolism, 95.00%, 19/20)、磷酸转移酶系统(93.33%, 28/30)、氨基糖和核苷酸糖代谢(amino sugar and nucleotide sugar metabolism, 86.36%, 19/22)、淀粉和蔗糖代谢(82.14%, 23/28);另外,属于核糖体代谢途径的 46 个差异表达基因全部下调表达(100%),其次是双组分系统(two-component system, 90%, 9/10)、半胱

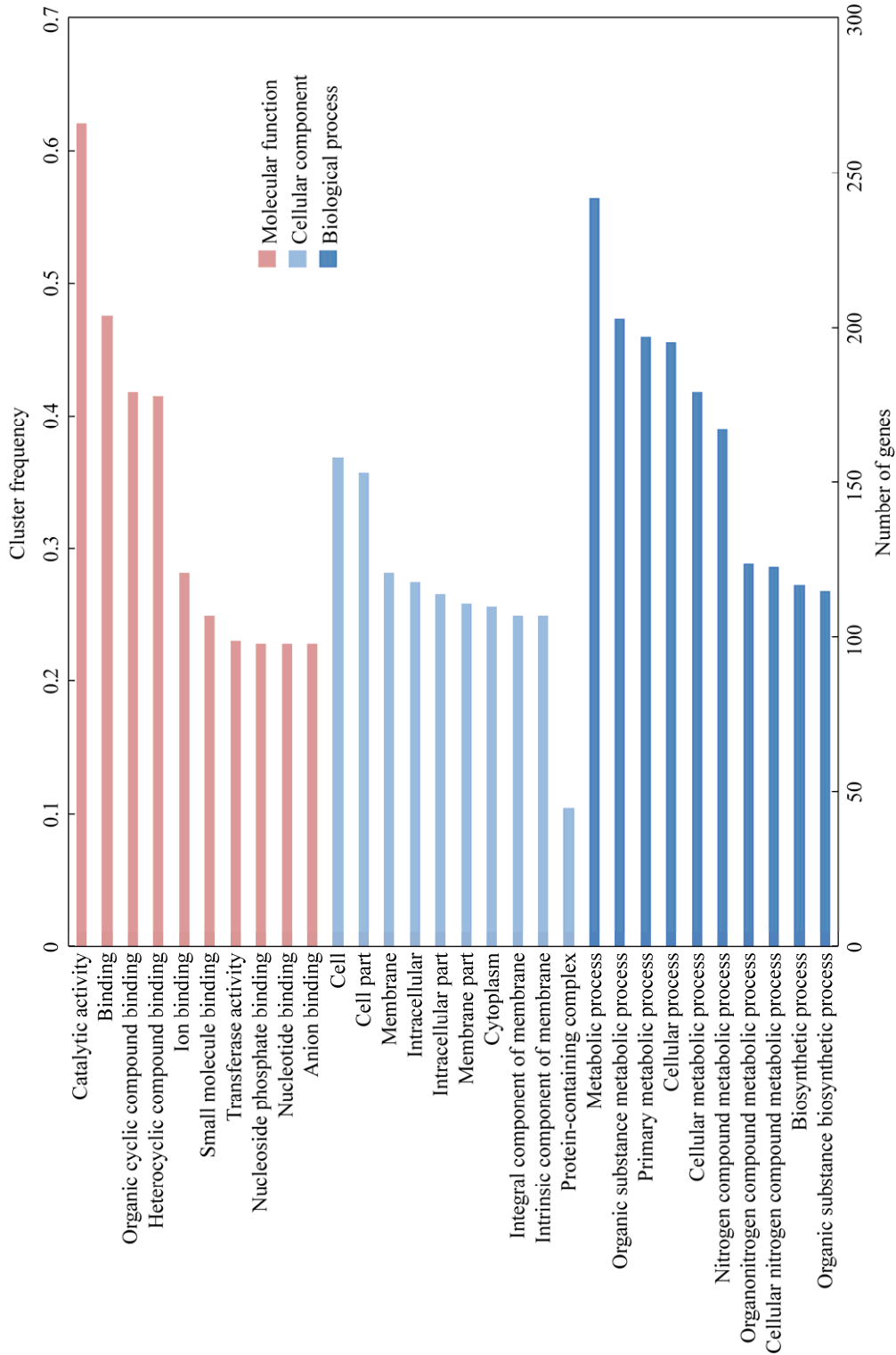


图 3 差异表达基因的 GO 注释分类图

Figure 3 GO annotation classification of differentially expressed genes.



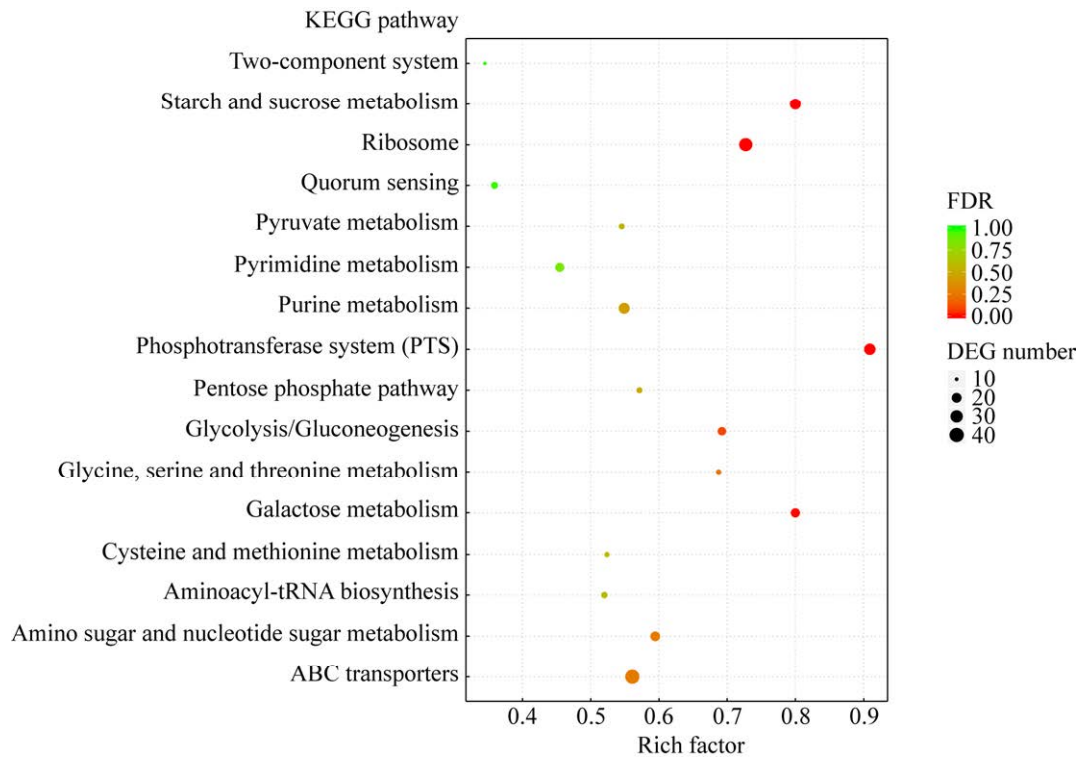


图4 包含最多差异表达基因的 KEGG 代谢通路 Rich factor 是指富集到该通路上的差异基因个数与注释到该通路上的所有基因数目的比值。图中圆点的大小表示注释到该通路的差异基因的多少，颜色表示该通路的显著性 FDR 值。FDR 是经过多重假设检验校正之后的  $P$  值

Figure 4 KEGG pathways with the most differentially expressed genes (DEG). Rich factor refers to the ratio of the number of differential expressed genes enriched in the pathway to the number of all genes annotated in the pathway. The size of the dot indicates the number of differential expressed genes annotated to the pathway; The color indicates the significant false discovery rate (FDR) value of the pathway. FDR is the  $P$ -value corrected value used in the multiple hypothesis testing.

氨酸和蛋氨酸代谢 (cysteine and methionine metabolism, 81.82%, 9/11) 及氨酰 tRNA 生物合成 (aminoacyl-tRNA biosynthesis, 76.92%, 10/13)。

值得注意的是，比较 2 种碳源培养条件下的猪链球菌转录组，参与糖酵解 (glycolysis) 代谢途径的基因表达量无显著变化，表明该途径的活性在 2 种碳源的生长过程中保持稳定。

## 2.5 糖原代谢与毒力因子表达的联系

根据文献[4,13]综述，当前已知或预测的猪链球菌毒力因子约 60 个。为了探究外源糖原利用对猪链球菌毒力因子表达的影响，根据转录

组数据，发现在糖原培养条件下有 30 个差异表达的毒力因子 (表 2) 和 29 个稳定表达的毒力因子 (表 3)。由表 2 可知，上调表达的毒力因子 19 个，特别是猪链球菌溶血素 (SLY)、黏附素 (Ssa、AbpB 和 ApuA) 和抗酸因子 (ArcABC) 等重要毒力因子，其糖原培养条件下的基因表达量相比葡萄糖培养条件升高了 20 倍以上。基因表达下调的毒力因子相对较少，只有 11 个，包含猪链球菌毒力标志蛋白 MRP。另外，一系列荚膜合成基因 (*cps*) 和唾液酸合成基因 (*neu*) 的转录量无变化 (表 3)。

## 2.6 转录组数据的 RT-qPCR 验证

为了评估转录组数据, 随机筛选 10 个差异表达基因, 采用实时荧光定量 PCR 的方法检测基因的转录情况。由 RT-qPCR 的数据可知(表 4), RT-qPCR 验证结果与 RNA-Seq 数据具有良好的-一致性, 而且诱导表达变化趋势相同, 证

实本研究中 RNA-Seq 分析的结果具有可靠性。

## 2.7 体外试验验证

猪链球菌分泌的 SLY 是其标志性的毒力因子<sup>[13]</sup>。转录组数据显示, 猪链球菌溶血素基因 *sly* 的转录水平升高了 41.61 倍(表 2), 因此采用体外溶血试验来验证糖原诱导后的猪链球菌的

表 2 差异表达的细菌毒力因子

Table 2 Bacterial virulence factors differentially expressed in glycogen compared to glucose

基因编号 Gene code	蛋白质 Protein	功能注释 Functional description	毒力 <sup>a</sup> Virulence <sup>a</sup>	相对表达倍数 Fold change	P 值 P-value
SSUSC84_1264	SLY	Suilysin	Haemolysin	41.610 6	0
SSUSC84_1176	Ssa	Fibronectin-binding protein	Adhesion ECM	21.218 5	0
SSUSC84_0178	HP0197	Hypothetical protein	Adhesion ECM	6.352 3	2.18E-89
SSUSC84_1662	PdhA	Pyruvate dehydrogenase, alpha subunit	Adhesion ECM	4.150 6	6.54E-76
SSUSC84_1248	AbpB	Amylase-binding protein B	Adhesion epithelium	120.399 8	0
SSUSC84_0269	DnaK	DnaK operon	Adhesion epithelium	7.087 1	2.56E-92
SSUSC84_0270	DnaJ	DnaK operon	Adhesion epithelium	7.581 0	5.18E-75
SSUSC84_1782	SsnA	Surface-anchored DNA nuclease	Adhesion epithelium	4.145 2	1.49E-115
SSUSC84_0242	SadP	Hypothetical protein	Adhesion epithelium	2.054 6	4.96E-33
SSUSC84_1871	ApuA	Amylopullulanase	Adhesion epithelium	65.435 9	0
SSUSC84_1248	PepD	Amynoacyl histidine peptidase	Subtilisin protease	120.399 8	0
SSUSC84_0555	ArcA	Arginine deaminase	Resistance to acidity	45.569 1	0
SSUSC84_0557	ArcB	Ornithine carbamoyltransferase	Resistance to acidity	68.029 1	0
SSUSC84_0558	ArcC	Carbamate kinase	Resistance to acidity	378.485 8	0
SSUSC84_1927	ArgR	Arginine repressor	Biological fitness	3.210 4	3.69E-10
SSUSC84_1086	HepI/III	Oligohyaluronate lyase	Hyaluronidase	24.336 5	2.00E-212
SSUSC84_1399	GtfA	Glycosidase	Unknown	85.185 2	3.91E-133
SSUSC84_0369	STP	Serine/threonine protein phosphatase	Regulatory factor	2.118 8	4.72E-35
SSUSC84_0370	STK	Serine/threonine protein kinase	Regulatory factor	2.134 2	4.54E-37
SSUSC84_1959	GidA	Glucose-inhibited division protein	Regulatory factor	0.187 3	1.54E-130
SSUSC84_0959	RelA	GTP pyrophosphokinase	Regulatory factor	0.289 0	2.19E-59
SSUSC84_0970	LDH	Lactate dehydrogenase	Adhesion ECM	0.408 4	2.80E-50
SSUSC84_0114	HtpsC	Type II histidine triad protein	Adhesion ECM	0.215 9	3.16E-84
SSUSC84_1480	PGM	Phosphoglycerate mutase	Adhesion ECM	0.329 4	1.95E-75
SSUSC84_0423	DivIVA	Cell division initiation protein	Adhesion epithelium	0.476 0	6.49E-35
SSUSC84_0150	GlnA	Glutamine synthetase	Adhesion epithelium	0.076 5	0
SSUSC84_1350	Eno	Enolase	Adhesion epithelium	0.299 9	9.28E-76
SSUSC84_0968	SrtA	Sortase A	Adhesion epithelium	0.469 6	1.59E-29
SSUSC84_0569	DltA	D-alanine-poly ligase	LTA D-alanylation	0.367 1	4.62E-53
SSUSC84_0671	MRP	Muramidase released protein	Marker	0.111 3	3.11E-263

注: <sup>a</sup>: ECM: 细胞外基质; LTA: 脂磷壁酸

Note: <sup>a</sup>: ECM: Extracellular matrix; LTA: Lipoteichoic acid.

表 3 稳定表达的细菌毒力因子

Table 3 Bacterial virulence factors stably expressed in glycogen compared to glucose

基因编号 Gene code	蛋白质 Protein	功能注释 Functional description	毒力 <sup>a</sup> Virulence <sup>a</sup>
SSUSC84_0502	Cps2C	Tyrosine-protein kinase	CPS biosynthesis
SSUSC84_0504	Cps2E	Putative galactosyl transferase	CPS biosynthesis
SSUSC84_0505	Cps2F	Putative rhamnosyl transferase	CPS biosynthesis
SSUSC84_1156	Cpss_lpl	Putative glycosyltransferase	CPS biosynthesis
SSUSC84_1157	Cpss_lpl2	Putative rhamnosyltransferase	CPS biosynthesis
SSUSC84_1477	PgdA	Peptidoglycan GlcNAc deacetylase	Peptidoglycan synthesis
SSUSC84_0517	NeuB	N-acetylneuraminic acid synthase	Sialic acid synthesis
SSUSC84_0518	NeuC	Putative UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase	Sialic acid synthesis
SSUSC84_0520	NeuA	N-acylneuraminic acid cytidyltransferase	Sialic acid synthesis
SSUSC84_1688	OppA	Oligopeptide-binding protein precursor	Adhesion ECM
SSUSC84_0466	EF-Tu	Elongation factor Tu	Adhesion ECM
SSUSC84_1234	Cbp40	Collagen type I-binding protein 40	Adhesion ECM
SSUSC84_1341	FBPS	Fibronectin/fibrinogen-binding protein	Adhesion ECM
SSUSC84_0179	DppIV	Dipeptidyl peptidase IV	Adhesion ECM
SSUSC84_0146	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Adhesion ECM
SSUSC84_1978	IMPDH	Inosine 5-monophosphate dehydrogenase	Adhesion ECM
SSUSC84_1906	Sbp2	Major truncated pilin subunit	Adhesion ECM
SSUSC84_1160	Atl	Autolysin	Adhesion ECM
SSUSC84_0300	FBA	Fructose-bisphosphate aldolase	Adhesion ECM
SSUSC84_0147	PGK	Phosphoglycerate kinase	Adhesion ECM
SSUSC84_0141	GroEL	Chaperonin	Adhesion ECM
SSUSC84_1958	GdpP	c-di-AMP phosphodiesterase	Adhesion epithelium
SSUSC84_1567	6PGD	6-phosphogluconate-dehydrogenase	Adhesion epithelium
SSUSC84_1795	IgaP	Putative surface-anchored serine protease	Invasion epithelium
SSUSC84_0362	LuxS	S-ribosyl homocysteinase	Quorum sensing
SSUSC84_0984	CiaH	TCS sensor histidine kinase	Regulatory factor
SSUSC84_0985	CiaR	TCS response regulator	Regulatory factor
SSUSC84_1811	Rgg	Transcriptional regulator	Regulatory factor
SSUSC84_0164	EF	Putative surface-anchored protein	Marker

注：<sup>a</sup>：CPS：荚膜多糖；ECM：细胞外基质；TCS：双组分系统

Note：<sup>a</sup>：CPS: Capsular polysaccharide; ECM: Extracellular matrix; TCS: Two component system.

溶血活性。如图 5A 所示，相较于葡萄糖培养的猪链球菌，糖原培养条件下的猪链球菌溶血活性显著增强。

研究统计了 30 种黏附素的转录水平(表 2 和表 3)，共计有 9 种上调表达、7 种下调表达和 14 种稳定表达。体外试验中，将葡萄糖和糖原诱导后的猪链球菌与 NPT<sub>r</sub> 细胞共培养发现，与葡萄糖相比，糖原诱导的猪链球菌对 NPT<sub>r</sub> 细胞黏附与侵入的细菌菌落总数(CFU)升高

(图 5B)，细胞侵入量更是显著升高(图 5C)，说明糖原诱导后的猪链球菌对上皮细胞的黏附和侵入能力显著增强。

## 2.8 动物模型验证

研究选择蜡虫作为感染模型来检测糖原对猪链球菌毒力的调控作用。在高剂量试验中，感染糖原培养条件下猪链球菌的蜡虫在 3 d 内全部死亡，而葡萄糖培养的猪链球菌感染的蜡虫最终存活率为 50%，存活率显著升高(图 6A)。

表 4 部分差异表达基因的 RT-qPCR 验证结果

Table 4 Validation of RNA-SEQ results by real time quantitative PCR (RT-qPCR)

基因编号 Gene code	名称 Name	功能描述 Functional description	RNA-Seq 结果 Fold change of RNA-Seq	RT-qPCR 结果 Fold change of RT-qPCR
SSUSC84_0015	<i>ftsH</i>	ATP-dependent zinc metalloprotease	0.287 6	0.21±0.03
SSUSC84_0092	<i>rpmJ</i>	50S ribosomal protein L36	0.138 0	0.08±0.03
SSUSC84_0249	<i>adhP</i>	Alcohol dehydrogenase	76.277 0	32.15±7.51
SSUSC84_0270	<i>dnaJ</i>	Molecular chaperone	7.581 0	2.84±0.65
SSUSC84_0376	<i>cysK</i>	Cysteine synthase A	0.157 1	0.17±0.12
SSUSC84_0671	<i>mrp</i>	MucBP domain-containing protein	0.111 3	0.04±0.01
SSUSC84_0917	<i>glgD</i>	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase subunit	25.536 6	13.47±3.86
SSUSC84_1079	<i>citZ</i>	Citrate synthase	0.057 6	0.02±0.01
SSUSC84_1262		PTS transporter subunit EIIC	16.986 8	17.15±3.15
SSUSC84_1724	<i>msmK</i>	ABC transporter ATP-binding protein	5.811 5	2.98±0.35
SSUSC84_1871	<i>apuA</i>	Surface-anchored amylopullulanase	65.435 9	28.47±6.00
SSUSC84_1959	<i>GidA</i>	tRNA uridine-5-carboxymethylaminomethyl synthesis enzyme	0.187 3	0.16±0.01

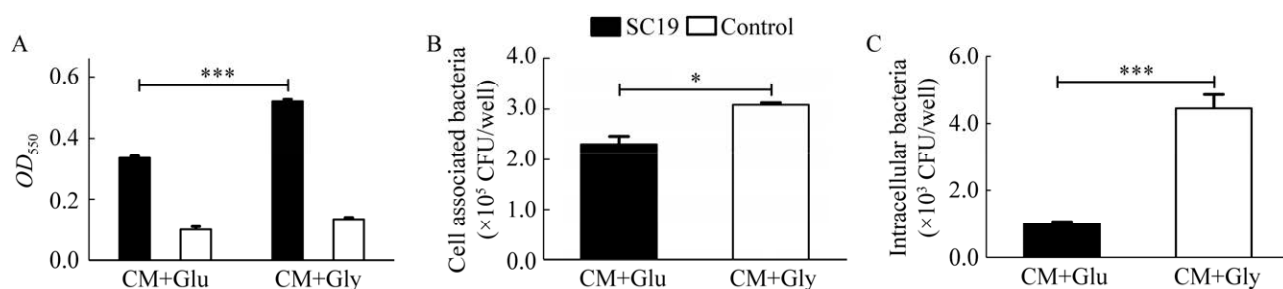


图 5 溶血(A)、黏附与侵入(B)及侵入(C)试验结果 由 GraphPad Prism 5 绘制图形和分析数据。试验结果以平均值±SEM 呈现。数据分析方法为 unpaired *t*-test (\*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ )

Figure 5 Results of hemolysis (A), adhesion and invasion (B), and invasion (C) assays. Histograms and statistical analysis were performed on GraphPad Prism 5. Data were presented as average±SEM and analyzed with unpaired *t*-test (\*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ).

在低剂量感染试验中, 葡萄糖培养组的存活率也显著高于糖原培养组(图 6B)。试验结果显示, 糖原诱导后猪链球菌的毒力变强。

### 3 讨论与结论

猪链球菌是一种兼性厌氧型细菌, 缺乏三羧酸循环必需的基因, 不具备完整的呼吸链, 因此无法进行呼吸代谢, 主要通过高乳酸或混合酸发酵的方式代谢碳水化合物<sup>[14]</sup>。相应地, 猪链球菌具有多种 PTS 系统或 ABC 转运子来摄

取广谱碳水化合物, 以应对随时变化的生存环境和营养因素, 不断调整代谢模式来适应生态位<sup>[15]</sup>。葡萄糖是多数细菌偏爱的速效碳源<sup>[3]</sup>。本研究结果表明, 猪链球菌能够利用外源糖原, 而且外源糖原对猪链球菌的生长促进作用与葡萄糖一致, 是猪链球菌优良的碳水化合物来源。

Willenborg 等用合成培养基、猪血和脑脊液分别培养猪链球菌, 通过体内外各种实验手段检测猪链球菌的代谢水平, 发现猪链球菌对这些具有不同营养条件的宿主生态位表现出代

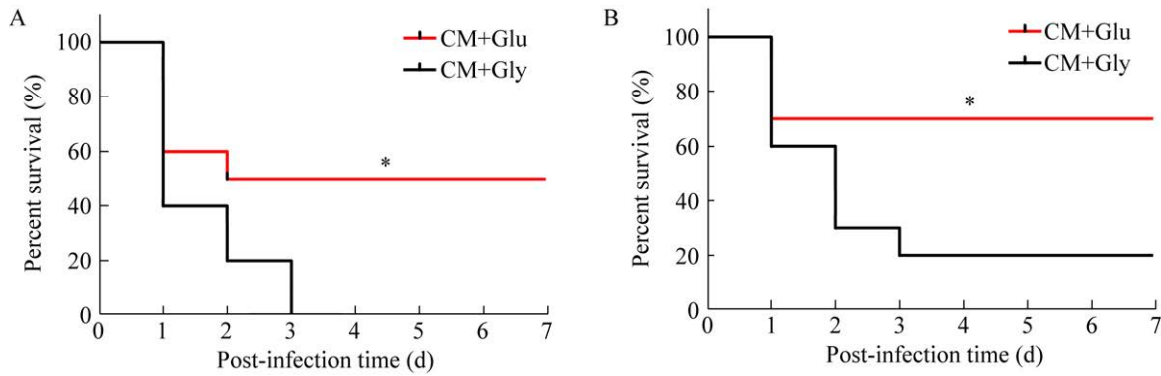


图 6 高剂量(A)和低剂量(B)细菌感染后蜡虫的存活率 由 GraphPad prism 5 绘制生存曲线和分析数据。数据分析方法为 Log-rank (Mantel-Cox) test (\*:  $P \leq 0.05$ )。两个组的阴性对照的存活率均为 100%，图中未显示

Figure 6 Survival curves of *G. mellonella* challenged with high dose (A) and low dose (B). Survival curves and statistical analysis were performed on GraphPad prism 5. Data were analyzed with Log-rank (Mantel-Cox) test (\*:  $P \leq 0.05$ ). The survival rates of the two negative control groups were both 100%, which was not shown in the figure.

谢适应性，但无论处于何种环境下，其关键的糖酵解途径保持稳定的活性<sup>[15]</sup>。本研究的转录组学数据显示，与葡萄糖相比，糖原培养条件下的猪链球菌基因组中 46.07% 基因的转录水平发生了变化，这些基因主要存在于碳源代谢和转运相关的途径，如富集程度最高的 PTS 系统、淀粉和蔗糖代谢以及包含了最多差异表达基因的 ABC 转运子，但糖酵解途径相关的基因转录水平保持稳定性，与上述研究结论一致。

肺炎链球菌的支链淀粉酶 SpuA、枯草芽孢杆菌的碱性支链淀粉酶 APase、化脓链球菌的支链淀粉酶 PulA、无乳链球菌的 I 型支链淀粉酶 SAP 及猪链球菌的双功能淀粉酶 ApuA 等一系列同源蛋白酶<sup>[10]</sup>可水解胞外淀粉、糖原等  $\alpha$ -葡聚糖，形成麦芽糊精等产物，经由 PTS 系统或 ABC 转运子转运至膜内，最终转化为葡萄糖-6-磷酸进入糖酵解途径。在 A 群链球菌深度感染小鼠软组织时检测到了  $\alpha$ -葡聚糖代谢通路相关基因的高峰度表达<sup>[16]</sup>。用 SC19 经鼻腔接种健康仔猪，运用选择性捕获技术比较感染脑、

肺组织中猪链球菌转录谱与体外培养猪链球菌转录谱，鉴定出 79 个猪链球菌基因在感染猪体内上调表达，包括 ApuA 和  $\alpha$ -葡聚糖代谢通路中的其他组分<sup>[17]</sup>。在体外试验中，用淀粉来培养猪链球菌时，其黏附和侵入相关的毒力基因表达量上调，菌株对仔猪的致病性也随之升高，而且在感染仔猪的关节液、心脏和脑中也检测到 *apuA* 和 *sly* 的高转录水平<sup>[4]</sup>。此外，用猪链球菌强毒株感染仔猪后，通过微阵列技术分析猪链球菌在不同感染时期的全基因组转录谱，也证实 *apuA* 和 *amy* 等  $\alpha$ -葡聚糖代谢通路的基因在感染猪的关节液、心脏和脑中高表达<sup>[18]</sup>。本研究用糖原培养的猪链球菌，其毒力因子表现出差异表达，除了溶血素 SLY 和 ApuA 等部分黏附素上调转录水平之外，抗逆性因子和一些酶类的转录量也大幅上升。另外，经体外试验和攻毒试验证实，糖原诱导后猪链球菌的溶血活性、黏附和侵入上皮细胞的能力、毒力确实显著增强。这些试验结果将猪链球菌的  $\alpha$ -葡聚糖代谢与感染宿主紧密联系起来，但两者之

间具体的关联机制还有待深入研究。

黏附素是猪链球菌重要的毒力因子,可特异性识别宿主细胞表面的碳水化合物或蛋白质受体,在细菌定殖、侵入宿主上皮内皮细胞、调节炎症反应及侵袭深层组织等方面起到了决定性的作用<sup>[13]</sup>。一系列 $\alpha$ -葡聚糖代谢的酶或组分是细菌的黏附素相关因子。A群链球菌的麦芽糊精特异性结合蛋白 MalE、PTS 转运蛋白 MalT、转移酶 AmyA 和支链淀粉酶 PulA 均可促进细菌在小鼠口咽腔的定殖,协助细菌入侵宿主上皮细胞<sup>[19]</sup>。肺炎链球菌中参与 $\alpha$ -葡聚糖代谢的6个酶是潜在的毒力因子,包括胞外识别蛋白 MalX、支链淀粉酶 SpuA/Pul、直链淀粉酶 SpAMY、磷酸海藻糖酶 AG13 和葡萄糖苷酶 AG31<sup>[20]</sup>。SpuA 随后被证实是肺炎链球菌重要的毒力因子,与二型肺泡细胞糖原有高度亲和性<sup>[21]</sup>,缺失 PulA 的化脓链球菌失去黏附5种人口咽腔肿瘤细胞系(牙龈、喉、舌、扁桃体和鼻)的能力<sup>[22]</sup>。SAP 介导 B 群链球菌对人宫颈上皮细胞的黏附,其亚单位疫苗可有效预防病原菌在宿主体内的定殖<sup>[23]</sup>。ApuA 是猪链球菌唯一的壁外锚定淀粉酶,具有切割 $\alpha$ -1,4-糖苷键和 $\alpha$ -1,6-糖苷键的双重活性,负责降解胞外淀粉、糖原等<sup>[10]</sup>。用糖原培养猪链球菌时, RNA-Seq 与 RT-qPCR 均检测到 *apuA* 的高转录水平,证明 ApuA 对于糖原诱导的响应。ApuA 已被证实是猪链球菌重要的黏附素,在猪链球菌黏附宿主上皮细胞过程中发挥重要功能<sup>[10,12]</sup>。据此可推测,猪链球菌中参与 $\alpha$ -葡聚糖代谢的其他组分也可能在猪链球菌致病过程中起着重要作用,特别是猪链球菌对宿主的自然栖息地定殖、上皮细胞黏附、组织深处侵袭等相关生理过程。

综上所述,本研究从碳水化合物利用的角度出发,通过转录组测序检测了2型猪链球菌

菌株 SC19 在糖原诱导下基因组的转录水平变化,分析了碳源代谢相关途径的响应或稳定性,并总结了已知毒力基因的差异表达,证实外源糖原能够广泛影响猪链球菌基因组的转录水平,进而调控猪链球菌的致病性,为深入探究碳源代谢与猪链球菌致病性间的关联机制提供一定的理论参考,也为揭示猪链球菌在感染过程中与宿主间动态的相互作用积累数据。然而目前尚无科学有效的实验方案来直接证实猪链球菌在宿主体内代谢 $\alpha$ -葡聚糖,还有一系列相关的科学问题,如宿主体内营养水平随病情发展的变化规律、猪链球菌与富含糖原的组织或细胞间动态的相互作用机制等尚不明确,有待深入研究。

## 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] Dong XX, Chao YJ, Zhou Y, Zhou R, Zhang W, Fischetti VA, Wang XH, Feng Y, Li JQ. The global emergence of a novel *Streptococcus suis* clade associated with human infections[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2021, 13(7): e13810
- [3] Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 613-624
- [4] Ferrando ML, Van Baarlen P, Orrù G, Piga R, Bongers RS, Wels M, De Greeff A, Smith HE, Wells JM. Carbohydrate availability regulates virulence gene expression in *Streptococcus suis*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89334
- [5] Doran KS, Fulde M, Gratz N, Kim BJ, Nau R, Prasadarao N, Schubert-Unkmeir A, Tuomanen EI, Valentin-Weigand P. Host-pathogen interactions in bacterial meningitis[J]. *Acta Neuropathologica*, 2016, 131(2): 185-209
- [6] DiNuzzo M, Maraviglia B, Giove F. Why does the



- brain (not) have glycogen?[J]. *BioEssays*, 2011, 33(5): 319-326
- [7] 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*, 2007, 179(3): 1842-1854
- [8] 陈琪. 猪链球菌 2 型在感染猪体内的组织定位和动态分布[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2008  
Chen Q. Study on dynamic distribution and location of *Streptococcus suis* type 2[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2008 (in Chinese)
- [9] 李薇. 猪链球菌 2 型感染相关基因 *hp0245* 和 *hp1311* 的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2012  
Li W. Functional characterization of *Streptococcus suis* serotype 2 infection-associated genes *hp0245* and *hp1311*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [10] Ferrando ML, Fuentes S, De Greeff A, Smith H, Wells JM. *ApuA*, a multifunctional alpha-glucan-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, mediates adhesion to porcine epithelium and mucus[J]. *Microbiology: Reading, England*, 2010, 156(Pt9): 2818-2828
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [12] 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
- [13] 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
- [14] Poolman B. Energy transduction in lactic acid bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, 12(1/2/3): 125-147
- [15] Willenborg J, Huber C, Koczula A, Lange B, Eisenreich W, Valentin-Weigand P, Goethe R. Characterization of the pivotal carbon metabolism of *Streptococcus suis* serotype 2 under *ex vivo* and chemically defined *in vitro* conditions by isotopologue profiling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(9): 5840-5854
- [16] Graham MR, Virtaneva K, Porcella SF, Gardner DJ, Long RD, Welty DM, Barry WT, Johnson CA, Parkins LD, Wright FA, et al. Analysis of the transcriptome of group A *Streptococcus* in mouse soft tissue infection[J]. *The American Journal of Pathology*, 2006, 169(3): 927-942
- [17] Li W, Liu L, Qiu DX, Chen HC, Zhou R. Identification of *Streptococcus suis* serotype 2 genes preferentially expressed in the natural host[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(7): 482-488
- [18] Arenas J, Bossers-De Vries R, Harders-Westerveen J, Buys H, Ruuls-Van Stalle LMF, Stockhofe-Zurwieden N, Zaccaria E, Tommassen J, Wells JM, Smith HE, et al. *In vivo* transcriptomes of *Streptococcus suis* reveal genes required for niche-specific adaptation and pathogenesis[J]. *Virulence*, 2019, 10(1): 334-351
- [19] Shelburne SA, Keith D, Horstmann N, Sumbly P, Davenport MT, Graviss EA, Brennan RG, Musser JM. A direct link between carbohydrate utilization and virulence in the major human pathogen group A *Streptococcus*[J]. *PNAS*, 2008, 105(5): 1698-1703
- [20] Abbott DW, Higgins MA, Hyrnuik S, Pluvinae B, Van Bueren AL, Boraston AB. The molecular basis of glycogen breakdown and transport in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(1): 183-199
- [21] Van Bueren AL, Ficko-Blean E, Pluvinae B, Hehemann JH, Higgins MA, Deng LH, Ogunniyi AD, Stroehner UH, El Warry N, Burke RD, et al. The conformation and function of a multimodular glycogen-degrading pneumococcal virulence factor[J]. *Structure*, 2011, 19(5): 640-651
- [22] Hytönen J, Haataja S, Finne J. Use of flow cytometry for the adhesion analysis of *Streptococcus pyogenes* mutant strains to epithelial cells: investigation of the possible role of surface pullulanase and cysteine protease, and the transcriptional regulator Rgg[J]. *BMC Microbiology*, 2006, 6: 18
- [23] Gourlay LJ, Santi I, Pezzicoli A, Grandi G, Soriani M, Bolognesi M. Group B *Streptococcus* pullulanase crystal structures in the context of a novel strategy for vaccine development[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(11): 3544-3552