

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(3):386-392; 4 March 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

猪链球菌 2 型分选酶 *srtBCD* 基因敲除株的构建及其生物学特性分析

陈红娜^{1,2}, 廖辉¹, 王长军^{1,2}, 潘秀珍¹, 唐家琪^{1,2*}

¹南京军区军事医学研究所, 南京 210002

²南京医科大学基础医学院, 南京 210029

摘要:【目的】阐明分选酶 *srtBCD* 基因在猪链球菌 2 型致病过程中的作用。【方法】利用同源重组原理构建中间为壮观霉素、两侧为 *srtBCD* 基因上下游片段的重组质粒, 将构建好的质粒电转化入猪链球菌感受态, 筛选 *srtBCD* 缺失的突变株, 并通过组合 PCR 和逆转录 PCR 对其进行验证。生物学功能实验研究 *srtBCD* 突变株和野毒株 05ZYH33 在生长速率、粘附、毒力等方面的差异。【结果】组合 PCR 和逆转录 PCR 结果均证实 *srtBCD* 突变株构建成功, 体外实验结果显示 *srtBCD* 缺失后细菌的生长速率减慢, 与 Hep-2 上皮细胞的粘附率明显降低, 小鼠毒力实验数据表明突变株毒力无明显变化。【结论】猪链球菌 2 型 *srtBCD* 基因与细菌的粘附能力有关, 为进一步研究猪链球菌 2 型的致病机理奠定基础。

关键词: 猪链球菌 2 型, *sortase BCD*, 基因敲除, 粘附, 毒力

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 03-0386-07

猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis* serotype 2, *S. suis* 2) 不仅可感染猪引起脑膜炎、关节炎、肺炎和败血症, 导致极高的病死率, 还可以通过伤口和呼吸道感染人并导致脑膜脑炎、败血症、心内膜炎以及急性死亡等临床症状。1998 年和 2005 年在我国江苏省和四川省分别暴发 *S. suis* 2 感染人的疫情, 患者中出现高比例的、国内外罕见的链球菌中毒性休克综合征 (*Streptococcus toxic shock syndrome*, STSS), 病人多在 1-3 天内死亡, 病死率高达 81.3%, 引发严重的公共卫生事件^[1-2]。菌毛作为细菌附属结构在细菌粘附和侵袭宿主特异性上皮细胞过程起着重要作用, 多种致病链球菌中的菌毛结构被证实为毒力因

子^[3]。和革兰阴性菌 (G^-) 相比, 革兰阳性 (G^+) 细菌毛编码基因与分选酶 *sortase (srt)* 基因成簇存在, *Srt* 催化菌毛单体共价交叉连接, 最后锚定到细胞壁上^[4]。本课题组已完成 *S. suis* 2 05ZYH33 全基因组测序和注释。通过基因组注释分析, 我们发现 *S. suis* 2 中共含有 2 种菌毛簇, 以其中含有的 *srt* 基因不同分别命名为 *srtBCD* 簇和 *srtF* 簇^[5]。Fittipaldi 等人证实 *srtF* 基因催化 *S. suis* 2 表面菌毛形成, 但其缺失后并未影响细菌的粘附和毒力^[6]。鉴于此, 本研究对分选酶 *Srt BCD* 进行探讨, 以期阐明 *srtBCD* 基因的缺失对细菌生物学功能的影响。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30730081, 30972638, 81071317); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2009042, BK2010025, BK2010114, BK2010113); 南京军区医学科技创新课题 (09Z040, 07Z045)

* 通信作者。Tel: + 86-25-84526002; Fax: + 86-25-84526002; E-mail: tjq85@hotmail.com

作者简介: 陈红娜 (1985-), 女, 河北邢台人, 硕士研究生, 主要从事猪链球菌致病机理的研究。E-mail: chen haoqi@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-11-19; 修回日期: 2010-12-30

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:文中所用菌株和质粒以及引物见表 1 和表 2。

1.1.2 供试菌株及培养条件: *S. suis* 2 05ZYH33 和

$\Delta srtBCD$ 突变株在 37℃ Todd Hewitt Broth (30 g/L) 培养基中震荡培养。*E. coli* DH5 α 在 37℃ LB(10 g Tryptone + 5 g Yeast Extract + 10 g NaCl/L) 培养基中培养。实验用抗生素浓度为:氨苄青霉素 (Amp) 100 mg/mL 壮观霉素 (Spc) 100 mg/mL、卡那霉素 (Kana) 100 mg/mL。

表 1 实验所用的菌株、质粒

Table 1 Bacterial strains, plasmids used in this study

Bacterial strains, plasmids	Properties/Function	Sources
Bacterial strains		
05ZYH33	High virulent strain of SS2 isolated from blood of a dead patient due to STSS	This lab
$\Delta srtBCD$	Spc^R , The <i>srtBCD</i> knock-out mutant of the strain 05ZYH33	This study
<i>E. coli</i> DH5 α	Cloning host for maintaining the recombinant plasmids	This lab
Plasmids		
pMD18-T	Amp^R , PUC18 derivative, TA cloning vector	TaKaRa
pUC18	TA cloning vector, lacZ, Amp^R	TaKaRa
pSET2	Spc^R , <i>E. coli</i> - <i>S. suis</i> shuttle vector	This lab
pUC18::srtBCD	Amp^R , Spc^R , A recombinant vector with the background of pUC18	This study

表 2 实验所用引物序列

Table 2 Primers used for PCR amplification and detection

Primers	Sequence of primers	Restriction sites	Sources
L-F	GAATTCCTTTGCTACACTGAATCT	<i>EcoR</i> I	This study
L-R	GGATCCTAGGATGAAGGGTGT	<i>Bam</i> H I	This study
R-F	CTGCAGAAATCCGAACTTCATTATT	<i>Pst</i> I	This study
R-R	AAGCTTTAGATGCCAGTCAAGTTT	<i>Hind</i> III	This study
Spc-F	GGATCCGTTCCGTAATACATGTATA	<i>Bam</i> H I	This study
Spc-R	CTGCAGGTTTTCTAAAATCTGAT	<i>Pst</i> I	This study
Check -F	GCCCGCTCCTTTTTGTAAT		This study
Check-R	TATGCGCTCGGAATGTTTGTCT		This study
Out-F	AAGAATGTATTGTCTACCTACAGG		This study
Out-R	AATAATATGTTGCCTTGTCGCTAT		This study

1.1.3 主要试剂和仪器:Ex Taq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒 DNA 抽提试剂盒及 RNA 反转录试剂盒均为 TaKaRa 公司产品。胶回收试剂盒、基因组及 RNA 提取试剂盒为 Promega 公司产品。Todd-Hewitt Broth (THB) 培养基购于 Difco 公司。Tryptone、Yeast Extract 购自 OXOID 公司。Gene Pulser Xcell™ 型电穿孔仪及电转杯为 BIO-RAD 公司产品。Ultrospec2000 型紫外分光光度计为 Pharmacia 公司产品。

1.1.4 实验动物:BALB/c 小鼠 (SPF 级), 雌性, 4 周龄, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。

1.2 05ZYH33 *srtBCD* 基因敲除突变株的构建和鉴定

1.2.1 *S. suis* 2 05ZYH33 *srtBCD* 生物信息学分析:

利用 BLAST 程序, 分别对 *srtBCD* 进行在线检索分析, 获得同 05ZYH33 野毒株 *srtBCD* 基因簇相似性显著的同源序列, Clustal X 软件对这些同源序列进行比对, 并通过 MEGA 4 软件分别绘制 SrtBCD 的进化树。

1.2.2 *S. suis* 2 05ZYH33 *srtBCD* 基因敲除突变株的构建:以 *S. suis* 2 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *srtBCD* 编码基因上下游 1000 bp 大小的片段; 同时以 pSET2 穿梭质粒 DNA 为模板, PCR 扩增壮观霉素抗性基因 Spc^R , 在限制性内切酶和 T4 连接酶的作用下, 3 个片段依次克隆入 pUC18 载体中, 形成 Spc^R 为中心, 左右含有 *srtBCD* 上下游序列的基因敲除重组质粒 pUC::srtBCD。将验证正确的重组质粒电转化入 05ZYH33 感受态细菌, 筛选含有 Spc^R 抗性的菌落, 采用组合 PCR 和 RT-PCR 对疑似突变

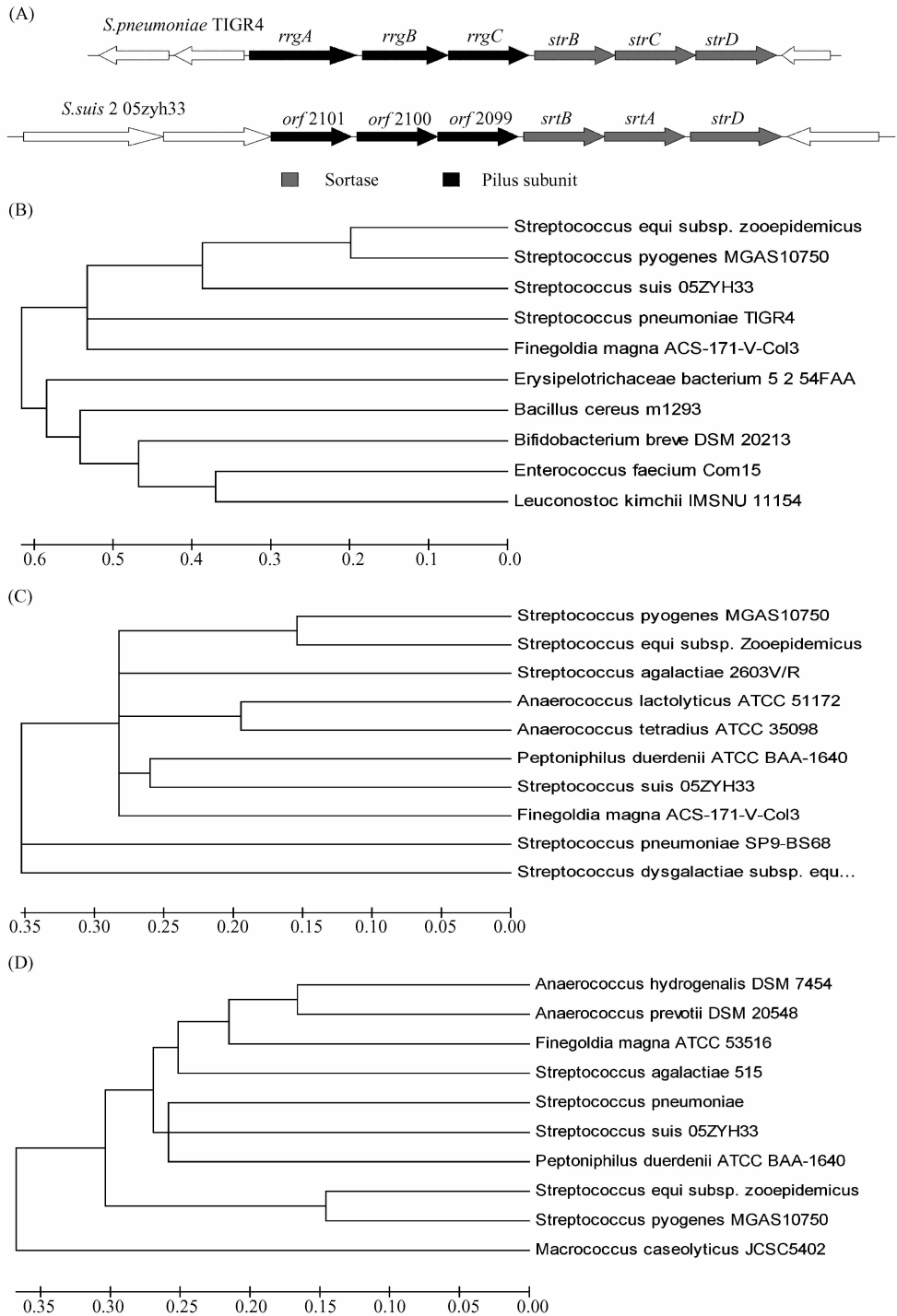


图1 *S. suis* 2 05ZYH33 srtBCD 的生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformation of srtBCD. A: Alignment of the gene island with the *S. pneumoniae* clusters; B: *S. suis* 2 05ZYH33 srtB phylogenetic trees based on comparison of amino acid sequences; C: *S. suis* 2 05ZYH33 srtC phylogenetic trees based on comparison of amino acid sequences; D: *S. suis* 2 05ZYH33 srtD phylogenetic trees based on comparison of amino acid sequences. Bar: phylogenetic distance.

株进行鉴定。

1.2.3 RT-PCR 鉴定:取适量的野生株 05ZYH33 和突变株 $\Delta srtBCD$ ($OD_{600} \approx 0.6$) 菌液提取 RNA, 将提取的 RNA 反转录成 cDNA, 并利用针对目的基因内部序列的 Check-F/R 引物对 cDNA 进行鉴定。

1.3 生物学特性分析

1.3.1 形态结构和溶血活性的比较:在相同的培养条件下, 观察野生株 05ZYH33 与突变株 $\Delta srtBCD$ 的基本生物学性状。采用分区划线法, 将菌液接种于 THB 平板, 37°C 培养箱孵育 48 h, 观察二者菌落形态和大小。

1.3.2 革兰染色:突变株和野生株细菌接种 THB 培养基(含 10% 胎牛血清)中培养至对数中期, 用接种环取样均匀涂布于载玻片上, 自然晾干后进行常规革兰染色, 于显微镜(1000 倍)下观察细菌形态。

1.3.3 生长速率的比较:取等量 ($OD_{600} \approx 0.008$) 的突变株和野生株菌液 37°C 振荡培养, 每间隔 1 h 测取 OD_{600} 值, 直至细菌生长处于稳定期, 重复实验 3 次并绘制生长曲线。

1.3.4 粘附实验:人类喉上皮细胞 Hep-2 用 RPMI 1640 (含 10% 胎牛血清)培养基、在 37°C、5% CO_2 细胞培养箱中培养。将生长状态良好的上皮细胞接种于 96 孔细胞培养板, 孵育培养至细胞铺满培养板(约为 10^5) (参照 Vanier [7-8] 等粘附实验的步骤并略作改动)。在 96 孔板中分别加入野生株 05ZYH33 和突变株 $\Delta srtBCD$ 细菌悬液 100 μL , 800 r/min 离心 10 min 后, 孵育 2 h。PBS 洗 3 次, 加入 200 μL 灭菌冷冻水裂解细胞, 取裂解液作 10 倍连续梯度稀释, 分别涂板计数, 实验重复 3 次。

1.3.5 小鼠致病实验:SPF 级 4 周龄 BALB/c 小鼠 20 只, 随机分为 2 组, 分别腹腔注射野生株 05ZYH33 和敲除株 $\Delta srtBCD$ 菌液 1 mL (约 1×10^8 CFU/只), 及时观察记录小鼠发病及死亡情况。

2 结果和分析

2.1 SrtBCD 的生物信息学分析

通过对 *S. suis* 2 05ZYH33 全基因组测序结果进行分析, Wang [5] 等人推测的 *S. suis* 2 中编码菌毛的 *srtBCD* 基因簇与多种链球菌的基因簇相似, 其中和肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) TIGR4 的

rlrA 基因簇高度同源(见图 1-A), 均含有 3 种菌毛亚基基因和 3 种催化菌毛合成的 *srt* 基因, 位置毗邻。进一步对 SrtBCD 蛋白比对分析, 结果如图 1 所示, *S. suis* 2 05ZYH33 SrtBCD 与不同种属细菌来源的同种蛋白具有非常显著的相似性(图 1-B、C、D)。

2.2 突变株的鉴定

将构建好的敲除质粒 pUC18::*srtBCD* 电转化 05ZYH33 感受态, 筛选敲除株。用位于目的基因内部的引物 Check-F/R 进行初次筛选, 扩增出 485 bp 片段。只有发生同源重组的情况下, *Spc^R* 基因将替代 *srtBCD* 基因整合入基因组中, 引物 SPC-F/R PCR 将能扩增出 *Spc^R* 基因, 引物 OUT-F/SPC-R PCR 能扩增出约 2 kb 片段, 引物 SPC-F/OUT-R PCR 能扩增出约 2.2 kb 片段; 而在 05ZYH33 中, 用以上引物进行 PCR 均应得到阴性结果, 扩增片段与理论值一致。

2.3 RT-PCR

为了进一步对 $\Delta srtBCD$ 突变株进行验证, 利用 Check-F/R 引物分别对突变株和野生株反转录得到的 cDNA 进行 PCR 扩增。野生株 05ZYH33 中结果为阳性, 说明 *srtBCD* 正常转录; 而在突变株 $\Delta srtBCD$ 中为阴性, 在转录水平证实 $\Delta srtBCD$ 突变株构建成功(图 2)。

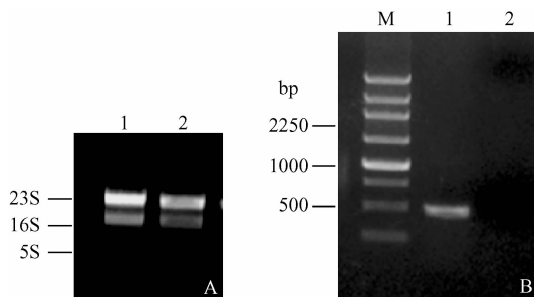


图 2 反转录 PCR 鉴定

Fig. 2 RT-PCR analysis of $\Delta srtBCD$. A: RNA of 05ZYH33 and $\Delta srtBCD$. RNA of 05ZYH33 (1), RNA of $\Delta srtBCD$ (2); B: IN-F/R PCR amplification using cDNA of 05ZYH33 and $\Delta srtBCD$. 250 bp DNA ladder marker (M), PCR amplification using cDNA of 05ZYH33 (1), PCR amplification using cDNA of $\Delta srtBCD$ (2).

2.4 生长特性

将突变株 $\Delta srtBCD$ 和野生株 05ZYH33 接种平板培养 48 h 后, 可见二者均长出浅灰色、表面光滑的细小菌落, 与野生株相比, 突变株 $\Delta srtBCD$ 的菌落直径较小(图 3)。革兰染色显示野生株和突变株

均为阳性, 菌体形态为圆形或椭圆形, 呈链状排列 (图 4), 外观无明显变化。同时, 生长曲线结果显示, 突变株对数期生长速率迟缓, 进入平台期的细菌密度值较野生株低 ($OD_{600} \approx 0.9$) (图 5)。

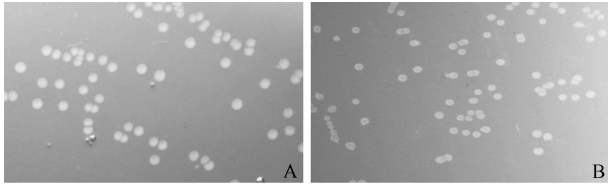


图 3 野生株 05ZYH33 和突变株 $\Delta srtBCD$ 的菌落形态

Fig. 3 Sheep blood THB plates of 05ZYH33 and $\Delta srtBCD$. A. The WT strain 05ZYH33; B. The $\Delta srtBCD$ mutant.

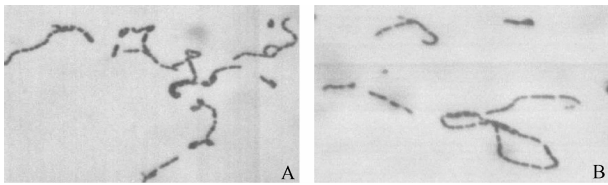


图 4 野生株 05ZYH33 和突变株 $\Delta srtBCD$ 的革兰染色

Fig. 4 Garm's stain of 05ZYH33 and $\Delta srtBCD$. A. The WT strain 05ZYH33; B. The $\Delta srtBCD$ mutant. (Magnification: 1000 \times).

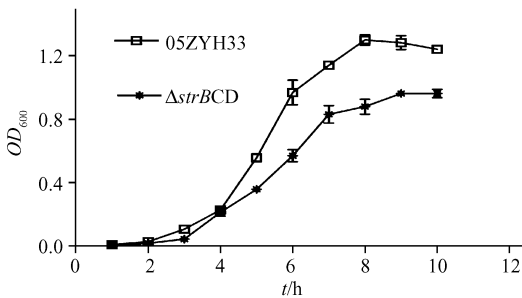


图 5 野生株和突变株生长速率比较

Fig. 5 Growth rate of the parent strain and mutant $\Delta srtBCD$.

2.5 粘附实验

在相同的培养情况下, 野生株 05ZYH33 和突变株 $\Delta srtBCD$ 菌液分别与 Hep-2 细胞作用, 结果如图 6 所示。突变株 $\Delta srtBCD$ 较野生株 05ZYH33 的粘附能力显著减弱 ($P < 0.01$)。提示 *S. suis* 2 *srtBCD* 参与细菌对宿主上皮细胞的粘附过程。

2.6 小鼠毒力实验

用同等剂量的野生株 05ZYH33 和突变株 $\Delta srtBCD$ 菌液攻击小鼠后, 两组小鼠均发病, 24 h 后, 野生株仅剩余 1 只存活, 突变株 $\Delta srtBCD$ 存活 2 只。提示 *srtBCD* 基因缺失后, 对野生株 05ZYH33 的毒力无明显影响。

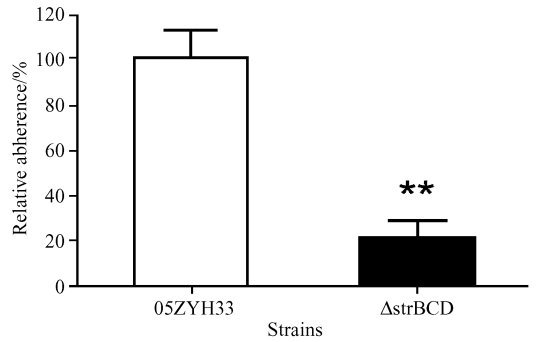


图 6 野毒株和突变株的粘附率比较

Fig. 6 Adherence of the WT strain 05ZYH33 and derived mutants with Hep-2.

3 讨论

Sortase 是普遍存在于 G^+ 菌中, 催化细菌表面蛋白与细胞壁锚定的一类分选酶^[3]。在 B 组链球菌中, *srtA* 基因缺失后影响表面蛋白 (ScpB) 和免疫原蛋白 (Alp2) 在细胞壁的锚定, 导致细菌和人类上皮细胞的粘附能力明显减弱^[9]。在金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、李氏杆菌中也均发现有 Srt 分选酶的存在, 在细菌的强致病性及引起强烈的宿主炎症反应方面扮演重要角色^[10-12]。同时, 本课题组前期在对 *S. suis* 2 05ZYH33 *srtA* 研究的过程中证实其参与细菌和人类上皮细胞的粘附以及对仔猪的感染能力^[5]。

最近, 有文献报道肺炎链球菌 SrtBCD 与菌毛蛋白位于同一个基因簇^[13], 催化细菌表面菌毛的形成过程。本研究通过生物信息学分析发现, *S. suis* 2 05ZYH33 中 SrtBCD 与菌毛蛋白 SSU2099、SSU2010、SSU2011 成簇存在, 和肺炎链球菌 TIGR4 的 *rlrA* 基因簇结构相似。进一步同源性比对结果显示, SrtB/SrtC/SrtD 分别与多种链球菌的同种蛋白高度同源。为了进一步研究 SrtBCD 分选酶在 *S. suis* 2 致病过程中所发挥的作用, 本研究构建了 *srtBCD* 缺失突变株, 并对其从基因水平和转录水平进行鉴定。通过生物学功能实验, 我们发现 $\Delta srtBCD$ 突变株和野生株 05ZYH33 成链形态及链长短均无明显差异。相同的培养条件下, 突变株菌落直径比野生株小, 生长速率明显比野生株慢, 这与本课题组前期研究的 $\Delta srtF$ 突变株的生长特性有些许差异。Barocchi 等报道肺炎链球菌 *srtBCD* 基因缺

失后影响细菌与宿主上皮细胞的粘附能力^[4,13]。同时,在 B 组链球菌中,与菌毛合成相关的 *srtC1*、*srtC2*、*srtC3*、*srtC4* 缺失后也会影响细菌的粘附能力以及生物被膜的形成过程^[14]。本研究结果显示 *S. suis* 2 05ZYH33 *srtBCD* 基因缺失后,突变株 Δ *srtBCD* 与 Hep-2 细胞粘附能力明显减弱,毒力未发生明显变化。

本课题基于同源重组原理构建了 *S. suis* 2 05ZYH33 *srtBCD* 基因敲除突变株,证实该基因参与细菌的粘附过程,表明其在 *S. suis* 2 致病过程中发挥作用。在此基础上我们将进一步通过研究 SrtBCD 分选酶催化的特定蛋白序列,以便能较全面的诠释该酶的生物学功能。

参考文献

- [1] Tang J, Wang C, Feng Y, Yang W, Song H, Chen Z, Yu H, Pan X, Zhou X, Wang H, Wu B, Wang H, Zhao H, Lin Y, Yue J, Wu Z, He X, Gao F, Khan AH, Wang J, Zhao GP, Wang Y, Wang X, Chen Z, and Gao GF. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *streptococcus suis* serotype 2. *PLoS medicine*, 2006, 3 (5): 668-676.
- [2] Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, Wang J, Zheng F, Pan X, Liu D, Li M, Song Y, Zhu X, Sun H, Feng T, Guo Z, Ju A, Ge J, Dong Y, Sun W, Jiang Y, Wang J, Yan J, Yang H, Wang X, Gao GF, Yang R, Wang J, and Yu J. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *s. suis* 2 chinese isolates. *PLoS One*, 2007, 2(3): e315.
- [3] Marraffini LA, Dedent AC, and Schneewind O. Sortase and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2006, 70(1):192-221.
- [4] Fälker S, Nelson AL, Morfeldt E, Jonas K, Hulthenby K, Ries J, Melefors O, and Henriques-Normark B. Sortase-mediated assembly and surface topology of adhesive pneumococcal pili. *Molecular microbiology*, 2008, 70(3):595-607.
- [5] Wang C, Li M, Feng Y, Zheng F, Dong Y, Pan X, Cheng G, Dong R, Hu D, Feng X, Ge J, Liu D, Wang J, Cao M, Hu F, and Tang J. The involvement of sortase A in high virulence of STSS--causing *streptococcus suis* serotype 2. *Archives of microbiology*, 2009, 191 (1):23-33.
- [6] Fittipaldi N, Takamatsu D, de la Cruz Domínguez-Punaro M, Lecours MP, Montpetit D, Osaki M, Sekizaki T, and Gottschalk M. Mutations in the gene encoding the ancillary pilin subunit of the *Streptococcus suis* srF cluster result in pili formed by the major subunit only. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8426.
- [7] Vanier G, Fittipaldi N, Slater JD, de la Cruz Domínguez-Punaro M, Rycroft AN, Segura M, Maskell DJ, and Gottschalk M. New putative virulence factors of *Streptococcus suis* involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells. *Microbial pathogenesis*, 2009, 46(1):13-20.
- [8] Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S, and Gottschalk M. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and immunity*, 2004, 72(3):1441-1449.
- [9] Lalioui L, Pellegrini E, Dramsi S, Baptista M, Bourgeois N, Doucet-Populaire F, Rusniok C, Zouine M, Glaser P, Kunst F, Poyart C, and Trieu-Cuot P. The SrtA Sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells, and for colonization of the mouse intestine. *Infection and immunity*, 2005, 73(6):3342-3350.
- [10] Ton-That H, Mazmanian SK, Faull KF, and Schneewind O. Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Sortase catalyzed in vitro transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH(2)-Gly(3) substrates. *The Journal of biological chemistry*, 2000, 275(13):9876-9881.
- [11] Chen S, Paterson GK, Tong HH, Mitchell TJ, and DeMaria TF. Sortase A contributes to pneumococcal asopharyngeal colonization in the chinchilla model. *FEMS microbiology letters*, 2005, 253(1):151-154.
- [12] Bierne H, Mazmanian SK, Trost M, Pucciarelli MG, Liu G, Dehoux P, J? nsch L, Garcia-del Portillo F, Schneewind O, and Cossart P. Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Molecular microbiology*, 2002, 43(4):869-881.
- [13] Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, Hemsley C, Albiger B, Kanth A, Dahlberg S, Fernebro J, Moschioni M, Massignani V, Hulthenby K, Taddei AR, Beiter K, Wartha F, von Euler A, Covacci A, Holden DW, Normark S, Rappuoli R, and Henriques-Normark B. A pneumococcal pilus influences virulence and host

inflammatory responses. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(8):2857-2862.

[14] Konto-Ghiorghi Y, Mairey E, Mallet A, Duménil G,

Caliot E, Trieu-Cuot P, and Dramsi S. Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS pathogens*, 2009, 5(5):e1000422.

Construction and *in vitro* assay of the sortase BCD geneknock-out mutant of *Streptococcus suis* 2

Hongna Chen^{1, 2}, Hui Liao¹, Changjun Wang^{1, 2}, Xiuzhen Pan¹, Jiaqi Tang^{1, 2*}

¹ Institute of Military Medical Sciences, Nanjing Command, Nanjing 210002, China

² School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract: [**Objective**] *Streptococcus suis* 2 is an emerging zoonotic pathogen responsible for a wide range of life-threatening diseases in pigs and humans. In this study, we investigated the functionality of one of *Streptococcus suis* 2 sortases, known as the *srtBCD*. [**Methods**] To obtain the isogenic mutant *srtBCD*, the competent cells of 05ZYH33 were subjected to electrotransformation with recombinant plasmid based on the principle of homologous recombination. The resulting mutant strains was further confirmed by a series of PCR and reverse transcription PCR. To better assess the role of *srtBCD* gene in the virulence of 05ZYH33, cell adherence assays and experimental infection of mice was adopted. [**Results**] A *SrtBCD* defective mutant of 05ZYH33 was found to be associated with growth curve upon cultivation in standard laboratory used in our *in vitro* assays. Furthermore, abolishment of the expression of *srtBCD* result in impaired interactions of *S. suis* with human laryngeal epithelial cell line. However, there is no differences when infection mice by the WT and mutant strain. [**Conclusion**] These results suggest that *srtBCD* are critical for the pathogen-host interaction of *S. suis* 2, but abolishment of *srtBCD* does not impair the full virulence of 05ZYH33. It is to expect that future study carried out with *S. suis* 2 to verification the conclusions.

Keywords: *Streptococcus suis* 2, Srt BCD, Gene knockout, Virulence assay

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of China (30730081, 30972638, 81071317), the Natural Science Foundation of Jiang-Su, China (BK2009042, BK2010025, BK2010114, BK2010113) and by the Medical Science Innovation Foundation of Nanjing Command (09Z040, 07Z045)

* Corresponding author. Tel: +86-25-84526002; Fax: +86-25-84526002; E-mail: tjq85@hotmail.com

Received: 19 November 2010/ Revised: 30 December 2010