



无乳链球菌鱼源株10 kb基因序列对细菌致病力的影响

刘广锦¹, 朱洁莲¹, 石紫薇¹, 丁铭¹, 王茹怡¹, 姚火春¹, 陆承平^{1*}, 徐跑^{2*}

¹ 农业部动物细菌学重点实验室, 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

² 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081

摘要: 【目的】在前期比较基因组学分析中, 我们发现中国无乳链球菌鱼源株GD201008-001基因组中有一段10 kb基因序列, 内含11个未知功能的开放阅读框。为了研究该段基因序列与细菌的致病力的关系, 本研究将这段基因进行了全段缺失。【方法】运用链球菌-大肠杆菌穿梭质粒pSET4s, 构建了10 kb基因缺失株(Δ 10 kb), 并通过生物学性状的比较, 细胞粘附试验, 斑马鱼攻毒试验和缺失前后毒力相关基因转录水平的检测, 评价该序列对无乳链球菌毒力的影响。【结果】经测序证明缺失株 Δ 10 kb构建成功, 与亲本株GD201008-001相比较, 缺失株 Δ 10 kb在细菌染色形态、对HEp-2细胞的粘附能力无明显差异, 但在培养液中的生长速度略慢; 缺失株 Δ 10 kb对斑马鱼的毒力明显增强, LD₅₀有极其显著的差异($P < 0.001$); 编码菌毛骨架蛋白2b的基因(*PI-2b*)和唾液酸酶基因(*neul*)在缺失株中的转录水平明显上升。【结论】该序列对无乳链球菌GD201008-001的毒力有显著的影响, 可能调控某些毒力基因的转录表达, 使细菌的毒力减弱。

关键词: 无乳链球菌, 10 kb 基因序列, 基因缺失, 斑马鱼感染模型, 毒力

自2009年以来, 我国南方罗非鱼(*Tilapia*)主养殖区每年夏季均暴发链球菌病, 高感染率和高死亡率对罗非鱼养殖产业造成了严重的危害。无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是造成我国罗非鱼链球菌病的主要病原^[1]。该菌不仅可以引发鱼类的脑膜脑炎, 还是人类新生儿败血症和脑膜

炎, 牛乳腺炎的主要病原之一。本人在广东罗非鱼主养区分离到多株致病性无乳链球菌, 对其中一株命名为GD201008-001的菌株进行了全基因组测序^[2]以及比较基因组学分析。结果显示^[3], 在我国分离的罗非鱼源无乳链球菌(GD201008-001, ZQ0910^[4]), 与在北美新生患儿体内分离到的无乳

基金项目: 江苏省自然科学基金青年科学基金(BK20140703); 国家自然科学基金青年科学基金(31502085); 农业部淡水渔业与种质资源利用重点实验室开放课题(KF201301); 江苏省优势学科项目(PAPD)

***通信作者.** 陆承平: Tel/Fax: +86-25-84396517, E-mail: lucp@njau.edu.cn; 徐跑: Tel/Fax: +86-510-85557959, E-mail: xup@ffrc.cn

收稿日期: 2015-04-10; **修回日期:** 2015-06-22; **网络出版时间:** 2015-07-07

链球菌A909在基因组序列、基因元件上最为相似, 进化关系也较近。这与Rosinski等的结论相同^[5], 提示我国的罗非鱼源无乳链球菌, 可能与某些人源无乳链球菌来源于同一祖先, 有感染人类的可能性, 对其的深入研究迫在眉睫。

当前已证实的无乳链球菌毒力因子主要有: 荚膜多糖(*cps*)^[6]、透明质酸裂解酶(*Hyl*)^[7]、 β -溶血素(*cyl*)^[8]、CAMP因子(*CAMP factor*)^[9]、补体C5-a肽酶(*scpB*)^[10]、粘连蛋白结合蛋白(*Lmb*)^[11]、菌毛(*PI*)^[12]、唾液酸酶(*neul*)^[13]、富色丝酸重复序列蛋白(*Srr*)^[14]、纤维蛋白原结合蛋白(*fbs*)^[15]以及超氧化物歧化酶(*sodA*)^[16]等, 在无乳链球菌的致病过程中发挥重要作用。分析无乳链球菌鱼源株的基因组发现, 所有鱼源菌株均不含*scpB*和*Lmb*基因^[3]。但无乳链球菌感染鱼类时, 有哪些毒力因子发挥了作用? 其分子致病机制是什么? 尚不清楚。

我们在比较基因组学分析中, 首次发现中国无乳链球菌鱼源株GD201008-001基因组(NCBI Reference Sequence: NC_018646.1)中含一段10 kb的序列^[3], 在其他宿主来源的无乳链球菌中尚未发现。该序列含11个基因, 功能均未见报道, 对氨基酸序列进行BLASTp比对, 与咽峡炎链球菌(*Streptococcus anginosus*)高度相似。咽峡炎链球菌为条件致病菌, 可导致宿主脑膜炎和肝脓肿^[17]。在这11个基因中, 包含一个LPXTG膜锚定蛋白(NCBI Reference Sequence: WP_000064507.1), DNA结合蛋白(WP_000661406.1), 噬菌体蛋白(WP_018543666.1), 噬菌体整合酶家族蛋白(WP_001019353.1)以及7个假定蛋白。经real-time PCR验证, 除了噬菌体蛋白(WP_018543666.1)不转录以外, 其中10个基因在GD201008-001基因组中均正常转录(未发表)。为了进一步探寻该10 kb序列的功能, 我们构建了该序列的基因缺失株, 并通过斑马鱼感染模型和缺失前后毒力相关基因转录水平的差异, 评价该序列对无乳链球菌毒力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与引物: 无乳链球菌鱼源株GD201008-001, 来自广东省肇庆市罗非鱼养殖区发病的奥尼罗非鱼脑内, 由本人分离、鉴定并保存于本实验室^[2]。复苏时用THB液体培养基37 °C培养。大肠杆菌DH5a培养在LB培养基中, 必要时加50 μ g/mL的壮观霉素, 用于缺失质粒的转化。链球菌-大肠杆菌穿梭质粒pSET4s^[18]由日本学者Daisuke Takamatsu馈赠。所有引物均由上海美吉生物医药科技有限公司合成, 见表1。

1.1.2 主要试剂: THB(Todd-Hewitt broth)培养基, 用于链球菌增菌培养, 购自美国BD公司; 无菌绵羊血购自江苏省疾控中心; *Pfu* PCR mix、胶回收试剂盒、DNA限制性内切酶、T4 DNA连接酶、DNase I、反转录试剂盒(PrimeScriptTM RT Kit)、SYBR premix Ex *Taq*TM Kit均为TaKaRa公司产品; E.Z.N.A.TM细菌RNA提取试剂盒为OMEGA公司产品; 质粒抽提试剂盒为上海生工公司产品; 壮观霉素, DL-苏氨酸均为Invitrogen公司产品; 三卡因间氨基苯酸乙脂甲磺酸盐(MS-222)购自杭州动物药品厂。其余试剂为进口或国产分析纯。THY培养基是在THB培养基中添加5%酵母浸出物。EB溶液(Elution Buffer) 0.0025 mol/L磷酸钾, 0.3 mol/L蔗糖。

1.1.3 主要仪器: 光学显微镜购自Olympus(奥林巴斯(中国)有限公司); 大型台式冷冻离心机为Heraeus公司产品; 微型离心机购自Eppendorf; Gene Pulse X cellTM型电穿孔仪为BTX公司产品; 0.1cm电击杯, PCR仪, Ultrospec 2000型紫外分光光度计和凝胶成像系统均购自Bio-Rad公司。

1.1.4 分子生物学软件: 本研究主要用到引物设计软件Primer Premier 5.0和Oligo; 序列编辑软件DNASTar; 序列BLAST在线比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); 使用GraphPad Prism 5 统计学

表1. 本试验用菌株、质粒和引物列表
Table 1. Characteristics of bacterial strains, plasmids and primers used in this study

Materials	Characteristics	References
Strains		
GD201008-001	Virulent strain of piscine <i>S. agalactiae</i> isolated in China	[2]
Δ10 kb	Mutation in specific gene island of GD201008-001	This study
<i>E. coli</i> DH5a	Cloning host for maintaining the recombinant plasmids	Invitrogen
Plasmids		
pSET4s vector	Temperature-sensitive <i>Streptococcus-E. coli</i> shuttle vector pSET4s; 4506bp; <i>Spc</i> ^R	[18]
simple pMD19-T	Simple T Vector	TaKaRa
Primers		
Δ10 kb A	CGCGTCGACGGAGATACCATGCGCGTA	This study
Δ10 kb B	AGTTGAACCGCCGTATGC	
Δ10 kb C	GCATACGGCGGTTCAACTTCATGAAATTCATGGCAA	
Δ10 kb D	TCCCCCGGGCCCAATACCAAGTAGCGT	

软件进行数据分析, $P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.001$ 差异极显著。

1.1.5 斑马鱼: 斑马鱼采用80日龄AB纯系斑马鱼, 由中国水产科学院珠江水产研究所提供。斑马鱼的饲养方法按照Neely方法并做适当修改^[19]。斑马鱼观察饲养一周确认健康后进行试验。试验期间, 水温为 26 ± 1 °C。

1.2 10 kb基因缺失质粒的构建

以GD201008-001基因组为模板, 分别用两对引物10 kb A/B, 10 kb C/D扩增10 kb序列的上下游片段。用融合PCR的方法将上下游片段连在一起, 限制性内切酶(*Sal* I和*Sma* I)消化, 把融合PCR产物连接simple pMD19-T载体, 测序正确后将片段克隆进链球菌-大肠杆菌穿梭质粒pSET4s, 构建10 kb缺失质粒(pSET4s-10 kb), 转化至大肠杆菌DH5α内, 提取质粒待用。

1.3 GD201008-001感受态细胞的制备

将含有GD201008-001的新鲜菌液按1:100转接至THY(加入0.04 mol/L DL-苏氨酸)培养液中, 37 °C, 180 r/min培养至 OD_{600} 在0.4–0.6之间; 菌

液冰浴30 min后, 8000×g, 4 °C离心15 min收集菌体; 用EB溶液重悬细菌, 同上离心, 重复重悬一次; 再用15%甘油溶液重悬细菌, 洗2次。最后用15%甘油溶液重悬菌体, 按80 μL/管分装, –70 °C冻存待用。

1.4 电转化

将缺失质粒(pSET4s-10 kb)按1:10的体积比加入GD201008-001感受态细胞中, 轻轻混匀冰浴15 min后转移至预冷的无菌电击杯中, 设置电转参数分别为电压2.35 kV, 电阻200 Ω和电容25 μF, 进行电转化。电击后, 立即向电击杯中加入电转复苏液1 mL, 使细菌悬浮, 再转入试管中, 28 °C、180 r/min振荡培养4 h, 加入终浓度为100 μg/mL的壮观霉素, 继续28 °C、180 r/min振荡培养至对数生长早期。

1.5 缺失株的筛选

根据Takamatsu等^[18]的方法, 并做改进。将电转后培养至对数生长的早期菌液涂布含壮观霉素的THB平板, 37 °C培养直至长出单菌落。挑取单菌落在含壮观霉素的THB液体中, 37 °C扩大培

养, 按1: 100转接至不含抗生素的THB培养液中, 28 °C、180 r/min培养至对数期。之后, 每次都按1: 100转接到不含抗生素的THB培养液中, 28 °C、180 r/min培养, 如此转代5–6次, 在温度和抗生素的双重选择环境下促使缺失质粒与基因组上具有相同序列的位置发生同源重组, 而未同源重组的质粒逐渐丢失。将传代的菌液稀释到 10^{-6} , 分别涂于壮观霉素抗性和无抗性的THB平板, 当无抗性的平板上长出的菌落比抗性平板上的菌落明显多时, 说明菌液中发生同源重组的细菌数量或者野生株的数量大大多于单交换, 未完全丢失质粒的细菌数量。此时可以挑选无抗性的平板上菌落, 用10 kb A/D引物进行PCR筛选。野生株基因组由于片段过长(>10 kb), 在普通PCR体系中扩增不出条带, 而以缺失株基因组为模板, 可以扩增出约1500 bp大小的条带, 这样的菌落作为疑似的缺失株。经10 kb A/D引物测序, 证实缺失株不含10 kb序列, 只含10 kb基因序列的上下游基因, 而且未有核苷酸突变位点, 说明缺失株构建成功, 命名为 $\Delta 10$ kb, 保存待用。

1.6 缺失株 $\Delta 10$ kb和野生株GD201008-001的生物学性状的比较

1.6.1 遗传稳定性分析与形态学比较: 缺失株进行连续传代, 在5代和第10代时通过PCR鉴定 $\Delta 10$ kb的遗传稳定性。同时, 取菌液进行革兰氏染色, 在油镜下观察细菌形态。

1.6.2 生长曲线的测定: 在相同培养条件下(37 °C, 180 r/min振荡培养), 按1:100的接种比例, 分别接种等量的野生株, 缺失株于100 mL的THB培养基中, 每隔1 h取样测 OD_{600} 下的吸光值, 连续测量12 h。同一菌株进行3次试验重复, 以培养时间为横坐标, OD_{600} 为纵坐标, 绘制野生株和缺失株的生长曲线, 比较有无差别。

1.6.3 半数致死量(LD_{50})的测定: 斑马鱼是小型鲤科鱼, 遗传背景清楚, 具备完整的特异性免疫系

统, 已作为多种细菌感染和免疫的研究模型, 如无乳链球菌、海豚链球菌、化脓链球菌等^[20]。与斑马鱼相比, 罗非鱼的品系繁多, 个体较大, 饲养成本高, 因此本次试验选用斑马鱼代替罗非鱼, 进行 LD_{50} 的测定。

在腹腔注射菌液之前, 先将斑马鱼浸泡在含95 μ g/mL的三卡因间氨基苯酸乙酯甲磺酸盐(MS-222)的水体中麻醉。在测定各菌株的 LD_{50} 前, 先将缺失株 $\Delta 10$ kb和野生株GD201008-001在斑马鱼体内复壮, 以避免菌株在体外长期传代后导致的毒力差异, 具体操作为: 腹腔注射菌液后, 从患病鱼脑内分离出细菌, 并进行PCR鉴定确认后备用。

复壮的细菌单菌落在THB液体培养基中37 °C培养至对数生长期(OD_{600} 为0.8), 用无菌PBS洗菌2次, 10倍梯度稀释成5个不同浓度的活菌液, 并用平板计数法加以确定。斑马鱼每组15只, 共5组, 麻醉后每只腹腔注射20 μ L菌液。对照组注射相同剂量的无菌PBS。注射后, 每组饲养于不同的鱼缸之中, 均置于28 °C温箱中。每天定时观察, 及时捞出死亡个体, 记录死亡数量, 连续观察7 d。同一菌株进行3次试验重复, 结果按照Reed-Muench法计算 LD_{50} 。

1.6.4 细胞粘附试验: 细菌感染机体的第一步就是粘附上皮细胞, 在体内定植, 因此细菌对上皮细胞粘附能力的强弱, 可作为评价细菌毒力的指标。HEp-2细胞(human laryngeal epidermoid carcinoma)是人喉癌上皮细胞, 它是研究细菌对上皮细胞粘附能力的最常用的细胞系之一^[21]。缺失株 $\Delta 10$ kb和野生株GD201008-001对HEp-2细胞的粘附试验参照Samen等^[22]的方法, 略有改动。HEp-2细胞(本实验室保存)用含10%胎牛血清的RPMI-1640营养液培养, 置于含5% CO_2 细胞培养箱, 37 °C培养至对数期, 细胞状态良好时, 以 1×10^5 cell/孔传代至24孔板上, 长至80%–90%单层后用于粘附试验。将对数生长期的细菌离心, PBS洗2次, 用

RPMP-1640营养液重悬，调整细菌浓度并平板计数，以复合感染比(MOI) 100，即 1×10^7 CFU/孔的菌悬液感染HEp-2细胞。接种后的24孔板至离心机中，室温，800×g离心10 min，使细菌与细胞充分接触。24孔板置37 °C、5% CO₂培养2 h，弃培养液，PBS洗涤5次，每次洗涤5 min。加200 μL/孔的0.1%胰酶消化15 min，再加800 μL灭菌双蒸水裂解细胞，反复吹打至细胞完全裂解。裂解液稀释后平板计数，比较缺失株Δ10 kb和野生株GD201008-001对HEp-2细胞粘附的差别。每次试验重复3次，每次每个菌株做3个重复孔。

1.7 实时定量PCR

为了进一步分析基因缺失后对主要毒力相关基因(*Hyl*, *cylE*, *CAMP factor*, *fbxB*, *SodA*, *Neul*, *PI-2b*, *Srr-1*)的转录水平影响，本研究对野生株和缺失株进行了real-time PCR分析，引物序列见表2。取生长至对数生长期($OD_{600}=0.8$)的菌株GD201008-001和Δ10 kb，参照细菌RNA提取试剂盒的操作说明，提取各菌株RNA，并用DNase I处理，以去除可能残留的基因组DNA。用反转录试剂盒(PrimeScript™ RT Kit)将RNA反转录为cDNA。参照试剂盒说明(SYBR premix Ex Taq™ Kit)，采用两步法real-time PCR分别检测两株细菌的8个毒力相关基因的mRNA转录水平。以GAPDH管家基因作为内参，进行3次有效重复，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[23]分析各基因的mRNA水平。

2 结果和分析

2.1 缺失株Δ10 kb的构建与鉴定

缺失质粒pSET4s-10 kb，经*Sal* I 和*Sma* I酶切鉴定以及测序正确后，电转入无乳链球菌感受态细胞内。在抗生素和温度条件下，最终筛选出疑似缺失株的菌落，用Δ10 kb A/D引物进行PCR检测，缺失株可扩增出1500 bp左右的片段，这正是Δ10 kb上下游基因的大小之和，而未缺失成功的

表2. Real-time PCR引物列表
Table 2. Characteristics of real-time PCR primers

Real-time PCR primers	Characteristics
GAPDH-F	GCTGCAAACATCGTTCCTAAC
GAPDH-R	GTGCAGCACCATCAAGTTTAC
Hyl- F	CCGAGGTGACACTTGAACTTTA
Hyl- R	GTGGATGCTCTGAGTCTTTAGG
cylE-F	CCAGGAAGTTACCCGATTGAG
cylE-R	GCCAGGAGGAGAATAGGAAATC
CAMP factor F	GTGGCTGGTGCATTGTTATTT
CAMP factor R	CCATTTGCTGGGCTTGATTATT
FbsB-F	GCAGCACACGATGCTATTTC
FbsB-R	GGTCATTTCCGCAGTTGTTAC
SodA-F	GCAAATGCTGCTCTTGAGAAA
SodA-R	TGATGACTGCCTGACGAATATC
Neul-F	TACCCGAAAGCAGTCATTCC
Neul-R	CTCTCCCGCTGTCTTTCTAAAT
PI-2b F	GTACTCGGTTGGTGATACAGTC
PI-2b R	CTACAGAAGCAGATGGCATAGT
Srr-1 F	AGAAGGTGTATTCTGCCTTACC
Srr-1 R	GGGTTGCACCAGTCATTAAAC

菌落，也就是野生株，它的目的序列过大(>10 kb)，在该PCR条件下没有扩增结果。经PCR产物测序后，确定缺失株Δ10 kb构建成功。

2.2 缺失株Δ10 kb和野生株GD201008-001的生物性状比较

2.2.1 遗传稳定性分析与形态学比较：缺失株进行连续传代，在5代和第10代时通过PCR鉴定，确定仍为缺失株，表明Δ10 kb的遗传稳定性良好。同时，取菌液进行革兰氏染色，在油镜下观察细菌形态(图1)，Δ10 kb和野生株在细菌形态、成链长度、染色特性上无差异，均为典型的革兰氏阳性，链状排列的球形或椭球型菌体。

2.2.2 生长曲线的比较：在相同的培养条件下，以培养时间为横坐标，OD₆₀₀为纵坐标，分别绘制

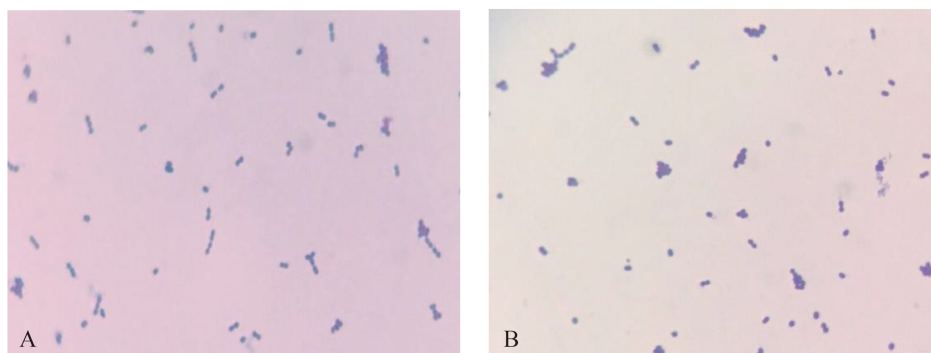


图1. 野生株GD201008-001(A)与缺失株Δ10 kb(B)的革兰氏染色镜检

Figure 1. Light microscope morphology of wild-type strain GD201008-001(A) and mutant Δ10 kb (B) using Gram staining.

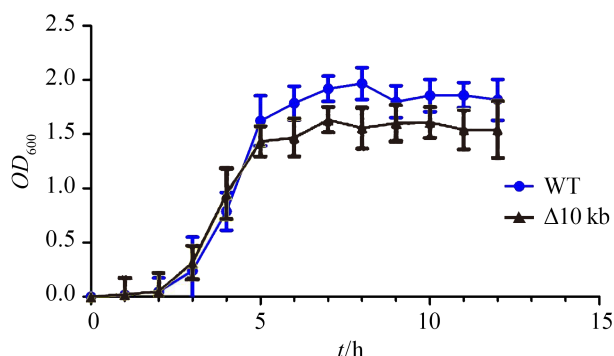


图2. 野生株GD201008-001与缺失株Δ10 kb的生长曲线
Figure 2. Growth curve of wild-type strain GD201008-001 and mutant Δ10 kb.

缺失株和野生株的生长曲线, 如图2所示, 野生株生长速度略快于缺失株, 稳定期的活菌数量多于缺失株, 但无明显差异。

2.2.3 缺失株Δ10 kb和野生株GD201008-001毒力的比较: 通过测定GD201008-001, Δ10 kb的LD₅₀, 分析特有基因岛对GD201008-001毒力的影响。结果显示(图3), Δ10 kb对斑马鱼的LD₅₀为 2.9×10^1 CFU/条, 野生株GD201008-001为 2.3×10^2 CFU/条, 缺失株的LD₅₀与野生株相比减少了约10倍, 毒力明显上升($P < 0.001$)。说明中国鱼源株10 kb序列的缺失可使细菌对斑马鱼的毒力明显增强。

2.2.4 HEp-2 cell粘附试验结果: 为了研究10 kb序

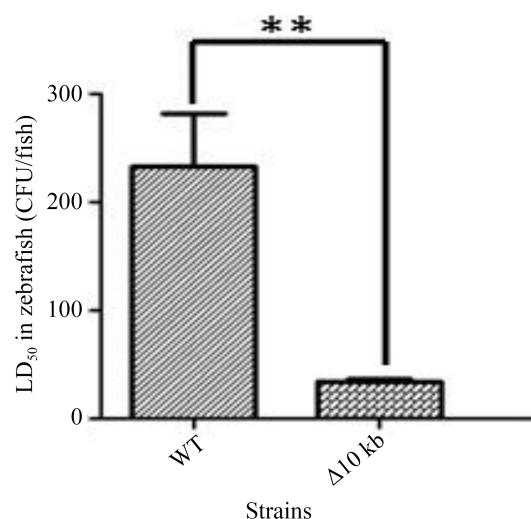


图3. 野生株、缺失株对斑马鱼LD₅₀的测定

Figure 3. LD₅₀ of wild-type and mutant in the zebrafish infection model (** $P < 0.001$).

列在无乳链球菌粘附宿主细胞中的作用, 比较野生株GD201008-001和缺失株Δ10 kb对HEp-2 cell的粘附能力。结果如图4所示, 野生株GD201008-001对HEp-2 cell的粘附率仅有0.4%, 与Samen等报道^[23]的人源无乳链球菌对HEp-2 cell有3%粘附率的结果相差甚远, 可能与菌株来自不同宿主有关。同时, 野生株与缺失株Δ10 kb对HEp-2 cell的粘附能力没有显著差异($P > 0.05$)。说明10 kb序列对无乳链球菌鱼源株GD201008-001粘附HEp-2 cell的能力没有影响。

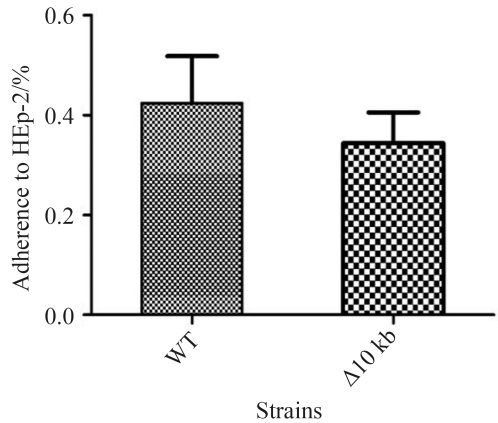


图4. 10 kb对无乳链球菌粘附HEp-2 cell的影响
Figure 4. Effects of 10 kb on *S. agalactiae* adherence to HEp-2 cells.

2.3 Real-time PCR分析毒力相关基因的表达

通过real-time PCR验证野生株, 缺失株的主要毒力相关基因(*Hyl*, *cylE*, *CAMP factor*, *fbxB*, *SodA*, *Neul*, *PI-2b*, *Srr-1*)的表达水平。图5显示, 对于毒力基因*Hyl*, *cylE*, *CAMP factor*, *fbxB*, *SodA*和*Srr-1*, 野生株与缺失株差异不显著, 但是菌毛骨架蛋白2b的基因(*PI-2b*)和唾液酸酶基因(*neul*)在缺失株中的表达水平显著提高, 分别提高了2倍和4倍。

3 讨论

本研究对中国鱼源株的10 kb序列进行全段缺失, 成功获得了缺失株 Δ10 kb, 说明这一基因序列不是菌株生长所必须的。缺失后, 细菌对HEp-2 cell粘附作用没有影响, 但是缺失株Δ10 kb对斑马鱼的毒力, 与野生株相比, 增强了大约10倍, 差异显著, 这一现象值得深究。一般认为, 病原微生物通过转化、转导或结合获得某些外源基因, 为了更好地适应环境生存, 毒力常常会增强。但本试验的发现是, 这段10 kb基因序列反而使细菌的毒力减弱。我们进一步推测, 在这10 kb序列中可能存在负转录调节因子, 负责抑制某些毒力基因的表达, 一旦将调控基因敲除, 毒力基因的表达上调, 使缺失株毒力增强。将10 kb中的各个ORF分别进行BLAST比对和结构域分析, 发现其中DNA结合蛋白(WP_000661406.1)可能是发挥该作用的转录调控因子。该蛋白含有典型的螺旋-转角-螺旋(Helix-Turn-Helix, HTH)结构域, 属于HTH-XRE家族蛋白^[24]。在金黄色葡萄球菌中, 同属于HTH-XRE家族的蛋白XdrA, 可与葡萄球菌A蛋白(SPA)的启动子结合, 调控spa

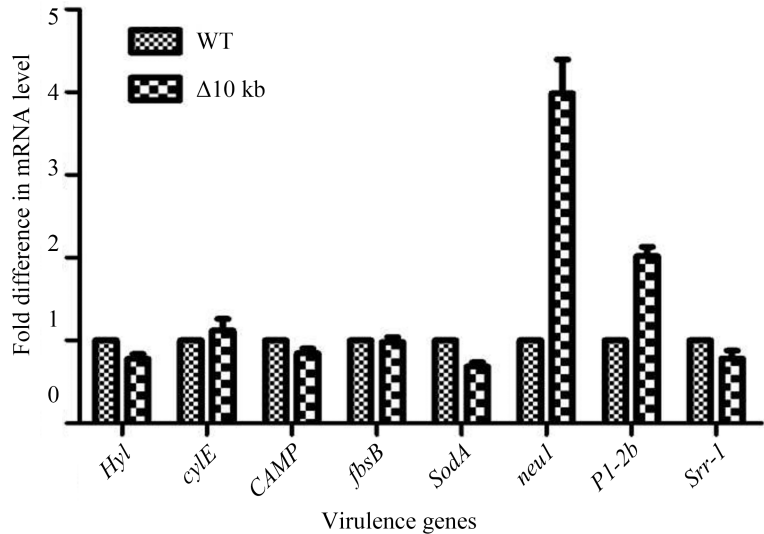


图5. 野生株和缺失株毒力基因的表达水平比较
Figure 5. The expression level of the virulence genes between wild-type and mutant.

的转录^[25]。创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)HlyU也是具有HTH结构域的DNA结合蛋白, 可与RTX毒素的*rtxA1*操纵子的启动子结合, 抑制RTX毒素的表达^[26]。

为了进一步证实缺失株的毒力增强是由于某些毒力基因的上调表达造成的, 我们利用real-timePCR, 对毒力基因的转录水平进行了分析。结果显示菌毛骨架蛋白2b的基因(*PI-2b*)和唾液酸酶基因(*neul*)在缺失株中的表达水平显著提高, 推测10 kb序列中的DNA结合蛋白可能下调了这两个毒力基因的表达, 具体的作用机制将是下一步的研究重点。已有研究表明, 菌毛可以帮助无乳链球菌抵抗抗菌肽的作用, 同时缺失菌毛骨架蛋白的无乳链球菌毒力减弱, 更易被吞噬细胞吞噬^[27]。细菌的唾液酸酶是一类糖苷水解酶, 可水解含唾液酸的糖蛋白、糖脂等为细菌提供碳源^[28], 并水解宿主细胞表面的唾液酸受体而促进细菌的感染^[29], 包括无乳链球菌在内的多种细菌的唾液酸酶都证实与细菌的致病力相关^[13, 30]。

另外, 这段10 kb序列的第一个ORF基因编号为A964_1956, 注释为Group II intron GBSi1, 即第二类内显子GBSi1。通常按剪接机制将内含子分为I, II, III类, 细菌的内显子属于第二类, 编码逆转录酶, 并可作为逆转录转座子, 插入基因组的某个区域^[31]。在细菌基因组中, Group II intron通常在其他一些DNA移动元件(DNA mobile elements)的周围, 协助这些移动元件及其中的基因片段发生基因的垂直或水平转移^[32]。我们在10 kb序列的末端也找到了另一个基因转移元件, 噬菌体整合酶家族蛋白, 基因编号为A964_1967, 它们的存在表示这段基因序列有可能借助基因转移原件, 被移动到基因组的其他位置甚至丢失, 从而导致GD201008-001的毒力变化, 这也是我们今后需要关注的。

参考文献

[1] Chen M, Li LP, Wang R, Liang WW, Huang Y, Li J, Lei AY,

Huang WY, Gan X. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China. *Veterinary Microbiology*, 2012, 159(3/4): 526–530.

- [2] Liu GJ, Zhang W, Lu CP. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* GD201008-001, isolated in China from tilapia with meningoencephalitis. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(23): 6653.
- [3] Liu GJ, Zhang W, Lu CP. Comparative genomics analysis of *Streptococcus agalactiae* reveals that isolates from cultured tilapia in China are closely related to the human strain A909. *BMC Genomics*, 2013, 14: 775–785.
- [4] Wang B, Jian JC, Lu YS, Cai SH, Huang YC, Tang JF, Wu ZH. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* ZQ0910, a pathogen causing meningoencephalitis in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(18): 5132–5133.
- [5] Rosinski-Chupin I, Sauvage E, Mairey B, Mangenot S, Ma L, Da Cunha V, Rusniok C, Bouchier C, Barbe V, Glaser P. Reductive evolution in *Streptococcus agalactiae* and the emergence of a host adapted lineage. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 252.
- [6] Moxon ER, Kroll JS. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors//Current Topics in Microbiology and Immunology: Bacterial Capsules. Berlin, Heidelberg: Springer, 1990, 150: 65–85.
- [7] Li SL, Jedrzejewski MJ. Hyaluronan binding and degradation by *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(44): 41407–41416.
- [8] Marchlewicz BA, Duncan JL. Lysis of erythrocytes by a hemolysin produced by a group B *Streptococcus* sp. *Infection and Immunity*, 1981, 34(3): 787–794.
- [9] Skalka B, Smola J. Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor--a new finding about diffusible exosubstances of *streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*. *Zentralblatt für Bakteriologie A*, 1981, 249(2): 190–194.
- [10] Bohnsack JF, Takahashi S, Hammitt L, Miller DV, Aly AA, Adderson EE. Genetic polymorphisms of group B *streptococcus scpB* alter functional activity of a cell-associated peptidase that inactivates C5a. *Infection and Immunity*, 2000, 68(9): 5018–5025.
- [11] Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Schnitzler N, Lütticken R, Podbielski A. Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of

- Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infection and Immunity*, 1999, 67(2): 871–878.
- [12] Rosini R, Rinaudo CD, Soriani M, Lauer P, Mora M, Maione D, Taddei A, Santi I, Ghezzi C, Brettoni C, Buccato S, Margarit I, Grandi G, Telford JL. Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(1): 126–141.
- [13] Musser JM, Mattingly SJ, Quentin R, Goudeau A, Selander RK. Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(12): 4731–4735.
- [14] Rajagopal L. Understanding the regulation of group B *Streptococcal* virulence factors. *Future Microbiology*, 2009, 4(2): 201–221.
- [15] Schubert A, Zakikhany K, Pietrocola G, Meinke A, Speziale P, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ. The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. *Infection and Immunity*, 2004, 72(11): 6197–6205.
- [16] Poyart C, Pellegrini E, Gaillot O, Boumaila C, Baptista M, Trieu-Cuot P. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infection and Immunity*, 2001, 69(8): 5098–5106.
- [17] Ruoff KL. *Streptococcus anginosus* ("*Streptococcus milleri*") the unrecognized pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 1988, 1(1): 102–108.
- [18] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid*, 2001, 46(2): 140–148.
- [19] Neely MN, Pfeifer JD, Caparon M. *Streptococcus*-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infection and Immunity*, 2002, 70(7): 3904–3914.
- [20] Kim BJ, Hancock BM, Del Cid N, Bermudez A, Traver D, Doran KS. *Streptococcus agalactiae* infection in zebrafish larvae. *Microbial Pathogenesis*, 2015, 79: 57–60.
- [21] N MN, Pfeifer JD, Caparon M. *Streptococcus*-Zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infection and Immunity*, 2002, 70(7): 3904–3914.
- [22] Amal MN, Zamri-Saad M, Siti-Zahrah A, Zulkafli AR. Transmission of *Streptococcus agalactiae* from a hatchery into a newly established red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)×*Oreochromis mossambicus* (Peters), farm. *Journal of Fish Diseases*, 2013, 36(8): 735–739.
- [23] Samen U, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ, Borges F. The surface protein Srr-1 of *Streptococcus agalactiae* binds human keratin 4 and promotes adherence to epithelial HEp-2 cells. *Infection and Immunity*, 2007, 75(11): 5405–5414.
- [24] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [25] Harrison SC. A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature*, 1991, 353(6346): 715–719.
- [26] McCallum N, Hinds J, Ender M, Berger-Bachi B, Stutzmann Meier P. Transcriptional profiling of XdrA, a new regulator of *spa* transcription in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(19): 5151–5164.
- [27] Evans JJ, Klesius PH, Pasnik DJ, Bohnsack JF. Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15(5): 774–776.
- [28] Pezzicoli A, Santi I, Lauer P, Rosini R, Rinaudo D, Grandi G, Telford JL, Soriani M. Pilus backbone contributes to group B *Streptococcus paracellular* translocation through epithelial cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 2008, 198(6): 890–898.
- [29] Severi E, Hood DW, Thomas GH. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology*, 2007, 153(Pt 9): 2817–2822.
- [30] Manco S, Hernon F, Yesilkaya H, Paton JC, Andrew PW, Kadioglu A. Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis. *Infection and Immunity*, 2006, 74(7): 4014–4020.
- [31] Kim S, Oh DB, Kang HA, Kwon O. Features and applications of bacterial sialidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(1): 1–15.
- [32] Staddon JH, Bryan EM, Manias DA, Dunny GM. Conserved target for group II intron insertion in relaxase genes of conjugative elements of gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(8): 2393–2401.
- [33] Héry-Arnaud G, Bruant G, Lanotte P, Brun S, Rosenau A, van der Mee-Marquet N, Quentin R, Mereghetti L. Acquisition of insertion sequences and the GBSi1 intron by *Streptococcus agalactiae* isolates correlates with the evolution of the species. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(17): 6248–6252.

Effect of the 10 kb sequence of piscine *Streptococcus agalactiae* on bacterial virulence

Guangjin Liu¹, Jielian Zhu¹, Ziwei Shi¹, Ming Ding¹, Ruyi Wang¹, Huochun Yao¹, Chengping Lu^{1*}, Pao Xu^{2*}

¹ Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

² Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] From the previous comparative genomic analysis, we found a specific unknown 10 kb sequence (including 11 Open reading Frames) in Chinese piscine strain GD201008-001 genome. To study the role of 10 kb in the pathogenicity of piscine *S. agalactiae*, the 10 kb sequence was deleted from the GD201008-001 genome. [Methods] The isogenic mutant Δ 10 kb was constructed by using the temperature-sensitive *Streptococcus-E. coli* shuttle vector pSET4s. We compared the growth characteristics, adherence to HEp-2 cell and bacterial virulence in a zebrafish infection model between wild strain and mutant. Meanwhile the expressions of the known virulence genes from GD201008-001 and Δ 10 kb were also quantified by real-time PCR. [Results] The Δ 10 kb showed no significant differences in bacterial morphology and adherence to HEp-2 cells compared with the wild-type strain, but the speed of growth was slightly slower than the wild strain. Furthermore the 50% lethal dose of Δ 10 kb was decreased up to 10-fold ($P < 0.001$) of the parental strain in a zebrafish infection model, and the expressions of the virulence genes, *PI-2b* and *neul*, were significantly increased in the mutant. [Conclusion] These findings demonstrated that the 10 kb sequence of piscine *Streptococcus agalactiae* exerts a significant effect on bacterial virulence and probably regulates the virulence genes expression of GD201008-001.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, the 10 kb gene sequence, mutant, zebrafish infection model, virulence

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Youth Foundation of Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20140703), by the Youth Foundation of National Natural Science Foundation of China (31502085), by the Open Fund from Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization (KF201301) and by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD).

*Corresponding author. Chengping Lu, Tel/Fax: +86-25-84396517, E-mail: lucp@njau.edu.cn; Pao Xu, Tel/Fax: +86-510-85557959, E-mail: xup@ffrc.cn

Received: 10 April 2015; Revised: 22 June 2015; Published online: 7 July 2015