



乙酰基转移酶毒素 SsGNAT 影响猪链球菌的黏附能力

朱夏雨¹, 古其兵^{1,2,3}, 杨雪梅⁴, 姚火春^{1,2,3}, 潘子豪^{1,2,3*}

1 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014

2 农业部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210014

3 世界动物卫生组织猪链球菌病参考实验室, 江苏 南京 210014

4 南靖县农业农村局, 福建 南靖 363600

朱夏雨, 古其兵, 杨雪梅, 姚火春, 潘子豪. 乙酰基转移酶毒素 SsGNAT 影响猪链球菌的黏附能力[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3574-3590.

ZHU Xiayu, GU Qibing, YANG Xuemei, YAO Huochun, PAN Zihao. Acetyltransferase toxin SsGNAT affects adhesion of *Streptococcus suis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3574-3590.

摘要:【目的】猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种重要的人畜共患病病原, 本研究旨在鉴定猪链球菌乙酰基转移酶毒素类毒素-抗毒素系统, 并对其毒素功能进行分析, 探讨猪链球菌毒素-抗毒素系统在细菌感染过程中发挥的作用。【方法】前期预测猪链球菌血清型 5 型菌株 HN105 基因组中假定的 II 型毒素-抗毒素系统。进一步鉴定毒素-抗毒素系统的活性并分析该毒素-抗毒素系统的遗传进化关系; 运用 Western blotting 揭示毒素在猪链球菌内的表达情况。同时以 HN105 为亲本株, 构建毒素缺失株、抗毒素缺失株以及毒素-抗毒素缺失株, 研究该系统对猪链球菌黏附能力、生物被膜形成能力、抗吞噬与胞内存活能力的影响。【结果】预测并鉴定出猪链球菌血清型 5 型菌株 HN105 基因组中 DF184_RS00980-DF184_RS00985 编码的乙酰基转移酶(Gcn5-related N-acetyltransferase, GNAT)毒素类毒素-抗毒素系统, 根据保守结构域将该系统命名为 SsMarR-SsGNAT。SsGNAT 毒素在大肠杆菌(*Escherichia coli*)的周质间隙发挥毒性作用, 且抗毒素可以中和毒素的毒性; 猪链球菌 SsGNAT 毒素与目前已鉴定的乙酰基转移酶毒素氨基酸序列一致性较低且亲缘关系较远; SsGNAT 毒素在猪链球菌内存在被切割的现象, 且抗毒素表达量降低可上调 SsGNAT 毒素的表达量; SsGNAT 毒素对猪链球菌的生物被膜形成能力、抗吞噬与胞内存活能力无影响, 但可影响猪链球菌对人喉癌上皮细胞(human laryngeal cancer epithelial cells, Hep-2)

资助项目: 江苏省研究生科研与实践创新计划(KYCX22_0780); 国家级大学生创业实践训练(202110307003S)

This work was supported by the Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX22_0780) and the National College Student Entrepreneurial Practice Training (202110307003S).

*Corresponding author. Tel: +86-25-84395328, E-mail: panzihao@njau.edu.cn

Received: 2023-01-04; Accepted: 2023-04-13; Published online: 2023-04-21

和人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells, HBMEC)的黏附能力。【结论】发现并鉴定了猪链球菌中新的II型毒素-抗毒素系统 SsMarR-SsGNAT, SsGNAT 毒素在大肠杆菌周质间隙发挥毒性作用, 缺失后导致细菌对细胞的黏附水平显著上升, 该发现为进一步揭示猪链球菌的致病机制提供参考。

关键词: 5型猪链球菌; 毒素-抗毒素系统; 毒素; 乙酰基转移酶; 黏附

Acetyltransferase toxin SsGNAT affects adhesion of *Streptococcus suis*

ZHU Xiayu¹, GU Qibing^{1,2,3}, YANG Xuemei⁴, YAO Huochun^{1,2,3}, PAN Zihao^{1,2,3*}

1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, Jiangsu, China

3 OIE Reference Laboratory for Swine Streptococcosis, Nanjing 210014, Jiangsu, China

4 Nanjing County Agriculture and Rural Bureau, Nanjing 363600, Fujian, China

Abstract: [Objective] *Streptococcus suis* is a major zoonotic pathogen. This study aims to characterize the acetyltransferase toxin of the toxin-antitoxin system in *Streptococcus suis* and analyze the functions of the toxin, which may contribute to exploring the role of the toxin-antitoxin system in the infection of *S. suis*. [Methods] We first predicted the putative type II toxin-antitoxin system in the genome of *S. suis* serotype 5 strain HN105. We further determined the activity and analyzed the phylogenetic relationship of the toxin-antitoxin system. Western blotting was employed to determine the expression of the toxin in *S. suis*. We constructed the toxin-deficient strain, antitoxin-deficient strain, and toxin-antitoxin-deficient strain with HN105 as the parental strain to explore the effects of the system on the adhesion, biofilm formation, anti-phagocytosis, and intracellular survival of *S. suis*. [Results] The Gcn5-related N-acetyltransferase (GNAT) toxin of the toxin-antitoxin system encoded by DF184_RS00980-DF184_RS00985 in the genome of the strain HN105 was predicted and identified, and the system was named SsMarR-SsGNAT based on the conserved domain. SsGNAT toxin exerted toxicity in the periplasmic space of *Escherichia coli*, and the antitoxin could neutralize the toxicity. SsGNAT toxin showed low amino acid sequence identity and distant genetic relationship with other acetyltransferase toxins. SsGNAT toxin was cleaved in *S. suis*, and the reduced expression of antitoxin upregulated the expression of SsGNAT toxin. SsGNAT toxin had no effect on the biofilm formation, anti-phagocytosis or intracellular survival of *S. suis*, while it affected the adhesion of *S. suis* to human laryngeal cancer epithelial cells (Hep-2) and human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) cells. [Conclusion] We discovered and identified the novel type II toxin-antitoxin system SsMarR-SsGNAT in *S. suis*. SsGNAT toxin exerted toxicity in the periplasmic space of *E. coli*, and its deletion promoted bacterial adhesion to cells. The findings provide a reference for further unraveling the pathogenic mechanism of *S. suis*.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 5; toxin-antitoxin system; toxin; acetyltransferase; adhesion

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种重要人畜共患病病原^[1-2]。临床症状包括脑膜炎、败血症和关节炎等,其流行对全球养猪业造成了巨大经济损失^[3]。人感染猪链球菌的病例在世界各地均有报道,我国于1998年、2005年暴发了2次猪链球菌感染人的疫情,分别造成14和39人死亡^[4-5]。猪链球菌血清型众多,根据荚膜多糖抗原的差异,猪链球菌可分为29种传统血清型、Chz型和近年来新发现的26种新的荚膜基因簇菌株^[6-11]。本研究所选用的亲本株HN105为猪链球菌血清型5型菌株,该血清型菌株可以感染人且有较强的毒力^[12-13],其致病机制尚不清楚。

毒素-抗毒素系统(toxin-antitoxin system, TA system)广泛存在于细菌和古菌的染色体与质粒上,通常由2个共转录的基因组成,分别编码不稳定的抗毒素分子和稳定的毒素蛋白^[14]。TA系统最初在大肠杆菌(*Escherichia coli*)的质粒上被发现,具有稳定质粒遗传稳定性的功能,也被称为分离后杀伤(post-segregational killing, PSK)机制^[15]。细菌基因组中的TA系统具有许多重要生物学功能,如影响细菌的耐药性、致病性、滞留菌的形成、黏附功能和生物被膜的形成能力等^[16-19]。因此,了解TA系统的生理功能与作用机制对致病菌防控与抗生素的合理开发与利用有重要意义。根据抗毒素的性质以及毒素-抗毒素的作用方式,目前共发现8种类型的TA系统^[20],其中II型TA系统在细菌基因组中分布最为广泛,具有重要生物学功能^[21]。在II型毒素-抗毒素系统中,毒素与抗毒素是由同一个操纵子调控表达的2个蛋白质,细菌在正常生长情况下抗毒素通过与毒素结合形成复合物中和毒素的毒性^[16]。而当细菌处于压力状态下时,不稳定的抗毒素被胞内蛋白酶水解,毒素释放发挥毒性作用,从而调控细菌的生命活动^[22]。目前已在 大肠杆菌、结核分支杆菌(*Mycobacterium*

tuberculosis)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等细菌中发现大量TA系统^[18-19,23],但对猪链球菌TA系统的研究仍然较少。

本研究前期通过在线工具TAfinder预测了猪链球菌血清型5型菌株HN105基因组中的一个II型TA系统SsMarR-SsGNAT,并发现其毒素基因DF184_RS00980编码一个乙酰基转移酶(Gcn5-related N-acetyltransferase, GNAT)。GNAT是存在于原核生物与真核生物中的一大类酶,通过将乙酰辅酶A的乙酰基团转移至底物发挥其生物学功能^[24-25]。目前有关乙酰基转移酶毒素的研究主要集中在革兰氏阴性菌如肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、大肠杆菌上^[26-28],在革兰氏阳性菌中尚未有相关报道。本研究以5型猪链球菌HN105为对象,探究SsGNAT毒素对猪链球菌黏附功能的影响,以期为更加深入了解猪链球菌GNAT毒素类毒素-抗毒素系统的毒性机制与生理功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

THB培养基购于青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;2×Taq PCR Master Mix购于南京诺唯赞生物技术有限公司;DNA Marker购于北京全式金生物技术有限公司。DNA片段回收试剂盒(DNA Fragment Purification Kit)购于湖南艾科瑞生物工程有限公司;DNA Polymerase购于TaKaRa大连宝生物工程公司;自然转化所用信号肽ComS(GNWGTWVEE)由南京金斯瑞生物科技有限公司合成;引物通过Oligo 6.24软件设计并由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2 菌株、细胞和培养条件

猪链球菌HN105分离自患病猪的关节液^[13],由本实验室保存。猪链球菌ZY05719分离自四

川资阳猪链球菌感染病猪, 由本实验室保存^[29]。猪链球菌在 THB 液体培养基中于 37 °C、180 r/min 摇床振荡培养至所需 OD_{600} 值或在 THB 固体培养基中于 37 °C、CO₂ 培养箱静置培养过夜, 根据需要添加终浓度为 10 µg/mL 的氯霉素或 10% (质量体积分数) 蔗糖。大肠杆菌 Top10、DH5α、BL21(DE3) 感受态在 LB 液体培养基中于 37 °C、180 r/min 摇床振荡培养至所需 OD_{600} 值或在 LB 固体培养基中于 37 °C 培养箱静置培养过夜, 根据需要添加终浓度为 100 µg/mL 的氨苄青霉素或 50 µg/mL 的卡那霉素。

小鼠腹腔巨噬细胞 RAW 264.7、人喉癌上皮细胞(human laryngeal cancer epithelial cells, Hep-2)、人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells, HBMEC)由本实验室保存。细胞在含有 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培养基中 37 °C、5% CO₂ 培养箱静置培养 12 h。

1.3 重组质粒的构建

用于构建重组质粒的引物序列见表 1。pBADHisA、pBADHisA-pelB 重组表达载体的构建: 以 HN105 为模板, 使用引物对 TA-T-F/TA-T-R、TA-F/TA-R 分别扩增毒素基因、毒素-抗毒素基因。目的基因纯化产物与 pBADHisA、pBADHisA-pelB 载体共同使用 *EcoR* I、*Xho* I 酶切。37 °C 水浴 30 min 后回收酶切产物。3 µL 酶切目的基因、3 µL 酶切载体与 4 µL 连接酶 Ligation Mix 混匀,

置于 16 °C、2 h, 连接目的基因与载体。

pET28a 重组表达载体的构建: 以 HN105 为模板, 使用引物对 pET28a-T-F/pET28a-T-R 扩增 *SsGNAT* 基因片段, 利用酶切位点 *Xho* I、*EcoR* I 将目的片段连接至 pET28a 表达载体中。将重组载体转入 DH5α 感受态细胞中并测序鉴定。提取连接正确的重组质粒, 放至 -20 °C 中备用。

1.4 转化大肠杆菌感受态

向无菌的 1.5 mL EP 管中加入 50 µL 大肠杆菌感受态与 10 µL 连接产物或 4 µL 重组质粒, 轻弹管壁混匀后冰浴 30 min。42 °C 水浴热激 90 s 后迅速置于冰上静置 2 min。向 EP 管中加入 900 µL LB 液体培养基, 混匀后置于 37 °C、180 r/min 摇床中复苏 1 h。5 000 r/min 离心 5 min, 弃去 900 µL 上清, 用剩余的培养基将菌体重悬, 均匀涂布于含 100 µg/mL 氨苄青霉素或 50 µg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上。37 °C 培养箱中静置培养过夜, 次日挑取单菌落进行 PCR 鉴定。

1.5 生长曲线的测定

将含有重组质粒以及载体 pBADHisA、pBADHisA-pelB 的大肠杆菌 Top10 于含 100 µg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜。次日以 1:100 转接到 50 mL 含 100 µg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中。当细菌 OD_{600} 值约为 0.3 时, 将培养物两等分, 一份加入终浓度为 0.2% 的 L-阿拉伯糖, 另一份不

表 1 用于构建重组质粒的引物序列

Table 1 Primers for construction of plasmids

Primers	Sequence (5'→3')	Endonuclease
TA-T-F	CCGGAATTC <u>TTAGAAATATTGTTCAAAAAGC</u>	<i>EcoR</i> I
TA-T-R	CCGCTCGAGATGAACATTGAAACCTATAAA	<i>Xho</i> I
TA-F	CCGGAATTC <u>TTAGAAATATTGTTCAAAAAGC</u>	<i>EcoR</i> I
TA-R	CCGCTCGAGTTGGAAAATTTAATTATACAG	<i>Xho</i> I
pET28a-T-F	CCGCTCGAGGAAATATTGTTCAAAAAGC	<i>Xho</i> I
pET28a-T-R	CCGGAATTCATGAACATTGAAACCTAT	<i>EcoR</i> I

The underlines indicate restriction enzyme sites.

加。之后每隔 2 h 测定细菌的 OD_{600} 值。以培养时间为横坐标, 细菌 OD_{600} 值为纵坐标绘制生长曲线。同时, 在加入终浓度为 0.2% 的 L-阿拉伯糖后, 每 4 h 用 PBS 稀释菌液并涂布于 LB 琼脂平板上, 37 °C 下培养过夜并计数菌落形成单位 (colony forming units, CFU)。

1.6 GNAT 氨基酸序列的比对和分析

在 NCBI 网站上搜索鼠伤寒沙门氏菌 TacT, 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 AtaT、AtaT2, 大肠杆菌 HS ItaT, 肺炎克雷伯菌 KacT, 弗氏志贺氏菌 GmvT 氨基酸序列, 用 CLUSTALW 进行氨基酸序列比对并利用 MEGA11 构建系统进化树。

1.7 缺失株的构建和鉴定

利用自然转化法构建猪链球菌缺失株^[30], 所用的引物序列见表 2。毒素有痕缺失株的构建方法如下: 使用引物对 T-U1-F/T-U1-R、T-D1-F/T-D1-R 分别扩增菌株 HN105 毒素基因 *DF184_RS00980* 的上下游同源臂序列。使用引物对 SacB-CM-F/SacB-CM-R 扩增含氯霉素抗性基因以及蔗糖敏感基因的中间片段 SacB-CM。使用引物对 R-T-you-F/R-T-you-R 通过融合 PCR 的方法连接上下游同源臂序列以及中间片段 SacB-CM。融合后的产物通过琼脂糖凝胶电泳分离并使用 DNA 胶回收试剂盒回收。将处于对数期的菌株 1:50 转接于 THB 液体培养基中, 37 °C、CO₂ 培养箱中静置培养。当细菌长到 OD_{600} 约为 0.042 时, 取 100 μ L 菌液加入 5 μ L 信号肽(GNWGTWVEE)和 10 μ L 上述融合片段产物, 于 37 °C、CO₂ 培养箱中静置培养 2 h。最后涂布于含氯霉素 10 μ g/mL 的 THB 平板, 次日挑取单菌落, 使用引物对 JC-T-F/JC-T-R、JC-T-you1-F/JC-T-you1-R、JC-T-you2-F/JC-T-you2-R、JC-SacB-CM-F/JC-SacB-CM-R 对毒素有痕缺失株进行 PCR 鉴定。毒素无痕缺失株的构建方法与毒素有痕缺失株类似。使用引物对 R-T-wu-F/R-T-wu-R 连接毒素基因上下游同

源臂序列进行自然转化, 使用 10% 蔗糖的 THB 平板进行筛选, 最后利用引物对 JC-T-F/JC-T-R、JC-T-wu-F/JC-T-wu-R、JC-SacB-CM-F/JC-SacB-CM-R 对毒素无痕缺失株进行 PCR 鉴定。抗毒素缺失株与毒素-抗毒素缺失株的构建方法同上。

1.8 SsGNAT 蛋白的表达和纯化

将 pET28a-SsGNAT 重组质粒转入 BL21(DE3) 感受态细胞, PCR 鉴定后, -80 °C 冻存备用。复苏阳性克隆后以 1:100 (体积分数) 转接至 200 mL LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.6。加入 0.5 mmol/L IPTG 并在 16 °C 下低温诱导 12 h。次日 4 °C、9 200 r/min 离心 5 min 收集菌体并用 PBS 洗 2 遍, 用 20 mL 上清溶解缓冲液重悬菌体并超声破碎 30 min, 超声破碎的频率为 50%, 每工作 4 s 间隔 10 s。收集上清并依次用 0.44 μ m 和 0.22 μ m 的滤器过滤。用 15 mL ddH₂O 清洗亲和层析柱; 用 5 mL 上清溶解缓冲液平衡镍柱; 将过滤后的上清溶液缓慢注入镍柱(过柱的速度为每 3 秒 1 滴); 用 10 mL 上清溶解缓冲液洗柱。使用范围为 50–500 mmol/L 咪唑浓度的上清洗脱缓冲液梯度洗脱蛋白并依次用 2 mL EP 管收集。

1.9 菌株组与纯化组 SsGNAT 蛋白 Western blotting 鉴定

提取菌株组总蛋白。参照文献[31]的方法对菌株组蛋白与纯化 SsGNAT 蛋白进行 Western blotting 检测。取等量蛋白加入 5 \times SDS loading buffer 并煮沸 15 min。离心收集上清, 进行 SDS-PAGE。电泳结束后将蛋白转印至聚偏氟乙烯 (poly vinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 并用 PBST (1 \times PBS+500 μ L Tween-20) 配制的 5% 脱脂奶于 37 °C、80 r/min 封闭 2 h。加入制备的鼠抗 SsGNAT 多克隆抗体(用脱脂奶 1:1 000 稀释), 于 37 °C、80 r/min 孵育 2 h。用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入羊抗鼠二抗(用脱脂奶 1:1 000

表 2 用于构建缺失株的引物序列

Table 2 Primers for construction of deletion strains

Primers	Sequence (5'→3')
SacB-CM-F	GGATAATGCTGAAAACCTCCTT
SacB-CM-R	TAATTCGATGGGTTCCGAGGC
JC-SacB-CM-F	TAACAAAGCATACTATGGCAA
JC-SacB-CM-R	GTGGCTCTAACTTATCCCAAT
Primers for construction and identification of toxin deletion strains	
T-U1-F	GTTGGCGTCTTGACGACAGCTGCT
T-U1-R	TTTTCAGCATTATCCGTTGACAAAAACAAATCCCTTAT
T-D1-F	GAACCCATCGAATTAAGACGCTCTTCAATGCTTCCT
T-D1-R	TGCGAGCAGTCTGTTTGCCGTC
R-T-you-F	CTTGATTTTCTAGGAGGGGCTTAT
R-T-you-R	CTTTAGCTTGAAACCCTTCTTCT
JC-T-F	ATTTTCTATACAGATGGATGG
JC-T-R	GAAGCATTATTGCTATGAAC
JC-T-you1-F	CGACTTTTATCCTCTATTTTAT
JC-T-you1-R	TTAGGATAGAATCATTTCATC
JC-T-you2-F	GCCACTTTATACAATTTTGTAT
JC-T-you2-D	ATACAGCTACGACAGTTTAACC
T-U2-F	GTTGGCGTCTTGACGACAGCTGCT
T-U2-R	GTTGACAAAAACAAATCCCTTAT
T-D2-F	TTTGTTTTGTCAACAAGACGCTCTTCAATGCTTCCT
T-D2-R	TGCGAGCAGTCTGTTTGCCGTC
R-T-wu-F	GTCTTGACGACAGCTGCTCTCC
R-T-wu-R	CAGTCTGTTTGCCGTCATTTTG
JC-T-wu-F	CTGTCCAAGTTTCTCATTTGTA
JC-T-wu-R	AAAATTAATTTTCAATTTAGCAAC
Primers for construction and identification of antitoxin deletion strains	
A-U1-F	GGTGCGGACATTTTTACT
A-U1-R	TTTTCAGCATTATCCGATGGACGTCAACACAGT
A-D1-F	GAACCCATCGAATTACAATAGACACCTCTGGCATT
A-D1-R	CTGTGCTTGTCTGTCAGGTCT
R-A-you-F	GGTGCGGACATTTTTACT
R-A-you-R	CTGTGCTTGTCTGTCAGG
JC-A-F	GATAAGTGTTCATTTGCTTC
JC-A-R	ATTTGCTAGGAAACAAATATC
JC-A-you1-F	TATCCAGGCGAGGTTT
JC-A-you1-R	GTTTGTGTTGCCGTAATGT
JC-A-you2-F	GGCATTACGTCTAACGA
JC-A-you2-D	TCTCTACTGGGTAGCCTA
A-U2-F	GGTGCGGACATTTTTACT
A-U2-R	CAGAGGTGTCTATTGGATGGACGTCAACACAGT

(待续)

(续表 2)

Primers	Sequence (5'→3')
A-D2-F	GTGTTGACGTCCATCCAATAGACACCTCTGGCATT
A-D2-R	CTGTGCTTGTCTGTCAGGTCT
R-A-wu-F	GGTGCGGACATTTTACT
R-A-wu-R	CTGTGCTTGTCTGTCAGG
JC-A-wu-F	ATTCGGAACGTTGTTGA
JC-A-wu-R	GCGAAGCTAAGACCATTA
Primers for construction and identification of toxin-antitoxin deletion strains	
TA-U1-F	TTGCAGTATGCGGTGATTTGCTTG
TA-U1-R	TTTTTCAGCATTATCCTAACTTAAAAGAACAAGATCAAGC
TA-D1-F	GAACCCATCGAATTAAATTAATTTTCCAATAGACA
TA-D1-R	TGGTCGCTCTGGAGGCTTTCC
R-TA-you-F	TTGCAGTATGCGGTGATTTG
R-TA-you-R	TGGTCGCTCTGGAGGCTTTC
JC-TA-F	TTAGAAAATATTGTTCAAAAAGC
JC-TA-R	TTGGAAAATTTAATTATACAG
JC-TA-you1-F	CCTTTGGATTGGGTGCGGACA
JC-TA-you1-R	ATGTGGTAGCCGTGATAGTT
JC-TA-you2-F	CGGCATTACGTCTAACGATA
JC-TA-you2-D	CCTTTGGCTCTGTCTCGAAG
TA-U2-F	TTGCAGTATGCGGTGATTTGCTTG
TA-U2-R	TAACTTAAAAGAACAAGATCAAGC
TA-D2-F	TCTTGTTCTTTTAAGTTAAATTAATTTTCCAATAGACA
TA-D2-R	TGGTCGCTCTGGAGGCTTTCC
R-TA-wu-F	TTGCAGTATGCGGTGATTTG
R-TA-wu-R	TGGTCGCTCTGGAGGCTTTC
JC-TA-wu-F	GCTCAAAACCCTGTCCAAGTT
JC-TA-wu-R	AATCCCTTCTATAAGTTTCTC

稀释)于 37 °C、80 r/min 孵育 40 min。用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。利用 ECL 化学发光液反应后在 Tanon-5500 仪器中曝光, 记录保存成像结果。

1.10 猪链球菌黏附能力测定

参照文献[31]的方法测定猪链球菌的黏附能力。将人喉癌上皮细胞(Hep-2)和人脑微血管内皮细胞(HBMEC)在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, 直到细胞在 24 孔细胞培养板中培养到单层(约 5×10^5 个细胞/孔)。将细菌

培养至对数期(OD_{600} 为 0.6–0.8)后用 DMEM 培养基洗涤并稀释至 5×10^7 CFU/mL。细胞培养板中每孔加入 1 mL 菌液, $800 \times g$ 离心 15 min, 并于 37 °C 孵育 2 h。将细胞用无菌 PBS 洗涤 5 次以除去未黏附的细菌。在细胞板每孔加入 900 μ L 无菌去离子水和 100 μ L 0.25%胰蛋白酶-EDTA 置于 37 °C 处理 10 min, 使细菌释放。将裂解液稀释并涂布于 THB 平板上, 37 °C、CO₂ 培养箱中静置培养过夜。次日计数 THB 平板上的细菌数量, 计算黏附率。本试验每个样品分为 3 份进

行测定, 并设置 3 次独立重复。

1.11 猪链球菌生物被膜形成能力测定

参照文献方法[17]的测定猪链球菌生物被膜形成能力。将野生株 HN105、毒素缺失株和抗毒素缺失株接种于 THB 液体培养基中生长至 OD_{600} 约为 0.6。取 2 μ L 菌液接种于每孔含有 200 μ L THB 液体培养基的 96 孔平底培养板中, 每株菌采用 10 个重复, 新鲜 THB 液体培养基作为阴性对照。将 96 孔平底培养板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中静置培养 3 d。弃去培养基, 每孔用 PBS 洗涤 3 次。用 200 μ L 甲醛固定 30 min 后弃去甲醛并在室温下干燥。用 0.1% 结晶紫室温下对生物被膜染色 30 min, 染色完毕后弃去染色液, 用自来水洗涤 2 次, 除去游离染色液。烘干后每孔加入 33% 乙酸并置于摇床中 30 min 以释放结晶紫; 用酶标仪测定其在 595 nm 波长处的吸光度。

1.12 猪链球菌抗吞噬和胞内存活能力测定

猪链球菌抗吞噬与胞内存活能力测定参照文献[32]的方法进行并作适当修改。将小鼠腹腔巨噬细胞 RAW 264.7 在 24 孔细胞培养板中培养至单层(约 7×10^5 个细胞/孔)。野生株 HN105、毒素缺失株和抗毒素缺失株培养至对数期后以感染比(multiplicity of infection, MOI)为 1 侵染细胞。置于 37 $^{\circ}$ C、 CO_2 培养箱中静置作用 1 h 后弃去上层液并用 PBS 洗涤 3 次。加入 500 μ L 含青霉素(终浓度 5 μ g/mL)和庆大霉素(终浓度 100 μ g/mL)的 DMEM 后置于 37 $^{\circ}$ C、 CO_2 培养箱中分别孵育 1、2、3 h。用 PBS 洗涤 7 次, 加入 1 mL ddH₂O, 室温裂解 10 min 后反复吹打细胞使其充分裂解。取适量裂解液倍比稀释后涂布于 THB 平板, 37 $^{\circ}$ C、 CO_2 培养箱中培养过夜并计数菌落。本试验每个样品分为 3 份进行测定, 并设置 3 次独立重复。

1.13 统计学分析

生长曲线测定、猪链球菌黏附能力测定、猪链球菌生物被膜形成能力测定、猪链球菌抗吞噬

与胞内存活能力测定均至少重复 3 次, 用 GraphPad Prism 8.0 软件分析数据并作图。使用双尾非配对 t 检验进行单因素分析, $P < 0.05$ 表示为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 SsMarR-SsGNAT 毒素-抗毒素系统的鉴定

为了验证 SsMarR-SsGNAT 毒素-抗毒素系统的活性, 使用 pBADHisA 质粒与 pBADHisA-pelB 表达载体分别构建含有毒素基因 *DF184_RS00980* 与毒素-抗毒素基因 *DF184_RS00980-DF184_RS00985* 的重组质粒 pBADHisA-*DF184_RS00980*、pBADHisA-*DF184_RS00980-DF184_RS00985*、pBADHisA-pelB-*DF184_RS00980*、pBADHisA-pelB-*DF184_RS00980-DF184_RS00985*。将构建成功的重组质粒与载体 pBADHisA、pBADHisA-pelB 分别转化至 Top10 感受态细胞, 待细菌的 OD_{600} 值约为 0.3 时, 加入终浓度为 0.2% 的 L-阿拉伯糖并测定其生长曲线。生长曲线测定与稀释点板试验结果显示, 毒素在细胞质中不发挥毒性作用(图 1A、1B)。由于已有文献报道毒素可以在周质间隙中发挥毒性^[17], 于是使用 pBADHisA-pelB 质粒引导蛋白到达周质间隙中, 在加入诱导剂阿拉伯糖后, 只含有 SsGNAT 毒素的菌株生长受到明显抑制, 而表达抗毒素后的菌株生长得到明显改善(图 1C), 说明毒素在周质间隙中发挥毒性作用, 并且其毒性可被对应的抗毒素中和。在加入诱导剂阿拉伯糖后每隔 4 h 对菌量进行计数, 发现含有毒素的细菌数量显著减少, 而抗毒素可在一定程度上中和毒素的毒性(图 1D)。上述试验结果证明猪链球菌 HN105 中 SsMarR-SsGNAT 是一对有活性的 II 型 TA 系统, 且毒素在大肠杆菌周质间隙中发挥毒性。

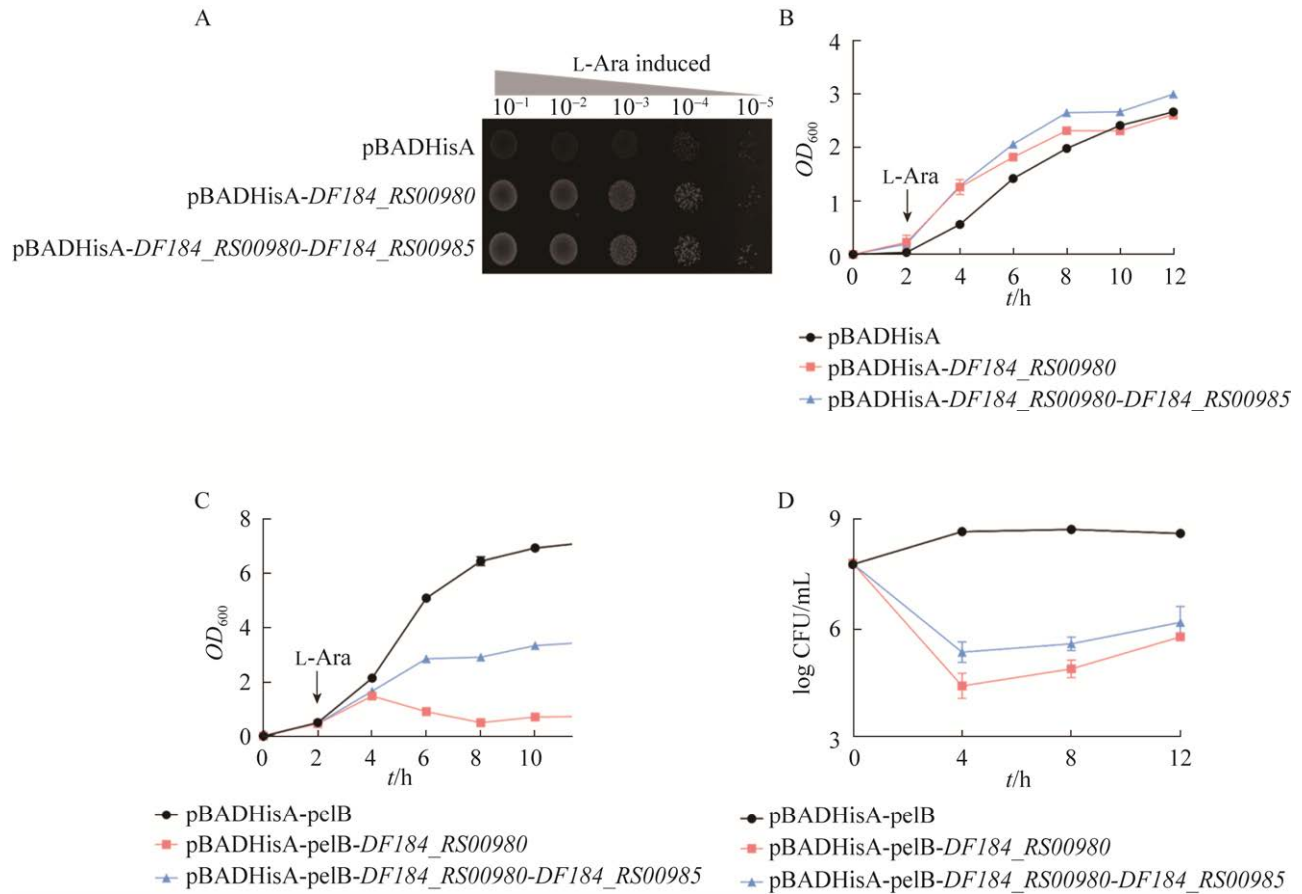


图 1 诱导剂诱导毒素、抗毒素表达对大肠杆菌 Top10 生长的影响

Figure 1 Effect of toxin and antitoxin induction on the growth of *Escherichia coli* Top10. A: The effect of SsGNAT toxin was detected by spot dilution assay. B: The cytoplasmic toxicity of SsGNAT was detected using pBADHisA plasmid. C: The periplasmic toxicity of SsGNAT was detected using pBADHisA-pelB plasmid. D: Cells were diluted and plated on LB agra plus 100 µg/mL ampicillin at the times indicated to quantitate CFU per milliliter. The error bars represent the standard deviation of at least three independent biological replicates.

2.2 SsGNAT 毒素多序列比对与系统进化关系分析

进一步结构预测分析发现毒素为乙酰基转移酶(Gcn5-related N-acetyltransferase, GNAT), 这类 TA 系统在革兰氏阴性菌中已有鉴定, 而在革兰氏阳性菌中还未有报道。本研究发现猪链球菌 SsGNAT 毒素在周质间隙发挥作用, 与现有文献报道的 GNAT 毒素发挥毒性的位置不同^[33-35]。这提示其毒性机制可能不同于其他细菌上发现的乙酰基转移酶毒素。因此将猪链球菌

SsGNAT 毒素与已发现的 GNAT 毒素氨基酸序列进行比对分析与系统进化分析。比对分析发现猪链球菌 HN105 中的 SsGNAT 毒素与鼠伤寒沙门氏菌、肠出血性大肠杆菌 O157:H7、大肠杆菌 HS、肺炎克雷伯菌和弗氏志贺氏菌中的 GNAT 毒素氨基酸序列一致性较低。系统进化分析发现猪链球菌 SsGNAT 毒素与目前已鉴定的乙酰基转移酶毒素氨基酸序列亲缘关系较远(图 2)。这些结果提示猪链球菌 SsGNAT 毒素作用靶点可能不同于目前已发现的 GNAT 毒素。

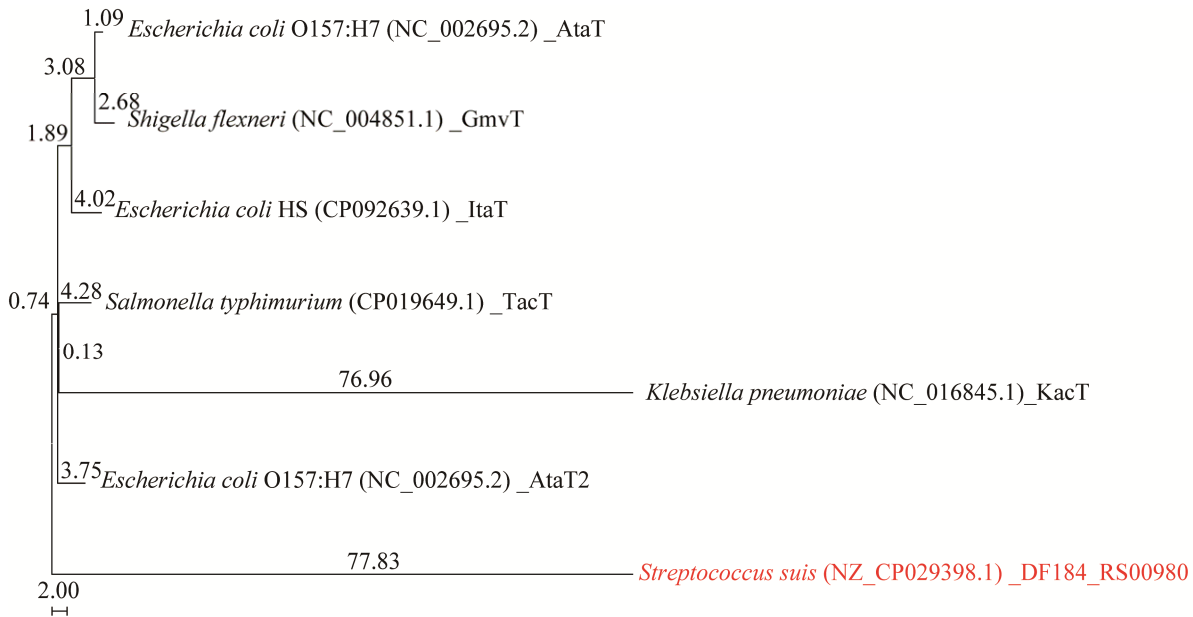


图 2 猪链球菌与革兰氏阴性菌 GNAT 毒素氨基酸序列系统进化分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of the amino acid sequences of GNAT toxin between *Streptococcus suis* and Gram-negative bacteria. The phylogenetic tree was built using MEGA 11 for homology analysis of GNAT toxin; The NCBI accession number of the strain is shown in brackets; The ruler represents the unit length of difference values between the amino acid sequences of GNAT toxin; The number represents the length of the evolutionary branch.

2.3 SsGNAT 毒素蛋白的纯化和 Western blotting 检测

为进一步探究 SsGNAT 毒素的功能, 本研究表达并纯化了 SsGNAT 毒素蛋白。SDS-PAGE 检测结果显示, 在 17.5 kDa 处出现了目的条带(图 3A), 大小与 SsGNAT 符合, 即为纯化的 GNAT, 且纯化效果较好。用制备的鼠源多克隆抗体进行 Western blotting (WB)检测, 结果显示 HN105 与 $\Delta DF184_RS00985$ 全菌蛋白组在 10–15 kDa 之间出现明显条带, 而 2 型菌株 ZY05719 全菌蛋白组并无相应条带(图 3B), 表明该多克隆抗体特异性良好。由于 WB 检测到的条带大小小于 SsGNAT, 进一步用纯化的 SsGNAT 蛋白进行 WB 检测以排除多克隆抗体的问题, 结果表明制备的多克隆抗体是可用的且具有较高的灵敏度(图 3C)。这些结果表明 SsGNAT 毒素在菌

体内可能被切割, 其切割的原因还有待进一步探究。同时抗毒素缺失株 $\Delta DF184_RS00985$ 中 SsGNAT 表达水平相比野生株显著增加(图 3B), 由于抗毒素 DF184_RS00985 预测为一个转录调控因子, 提示 DF184_RS00985 对 SsGNAT 毒素存在负调控作用。

2.4 SsGNAT 毒素对猪链球菌黏附能力的影响

猪链球菌 SsGNAT 毒素在大肠杆菌周质间隙发挥毒性, 提示其乙酰化的底物可能是胞壁蛋白或肽聚糖。而已有研究表明细菌的一些胞壁蛋白与肽聚糖参与细菌的黏附功能^[36-37]。因此通过构建缺失株的方法分析猪链球菌 SsGNAT 毒素是否影响猪链球菌的黏附能力。结果显示, 与野生株相比, 毒素缺失株 $\Delta DF184_RS00980$ 与毒素-抗毒素缺失株 $\Delta DF184_RS00980-DF184_RS00985$

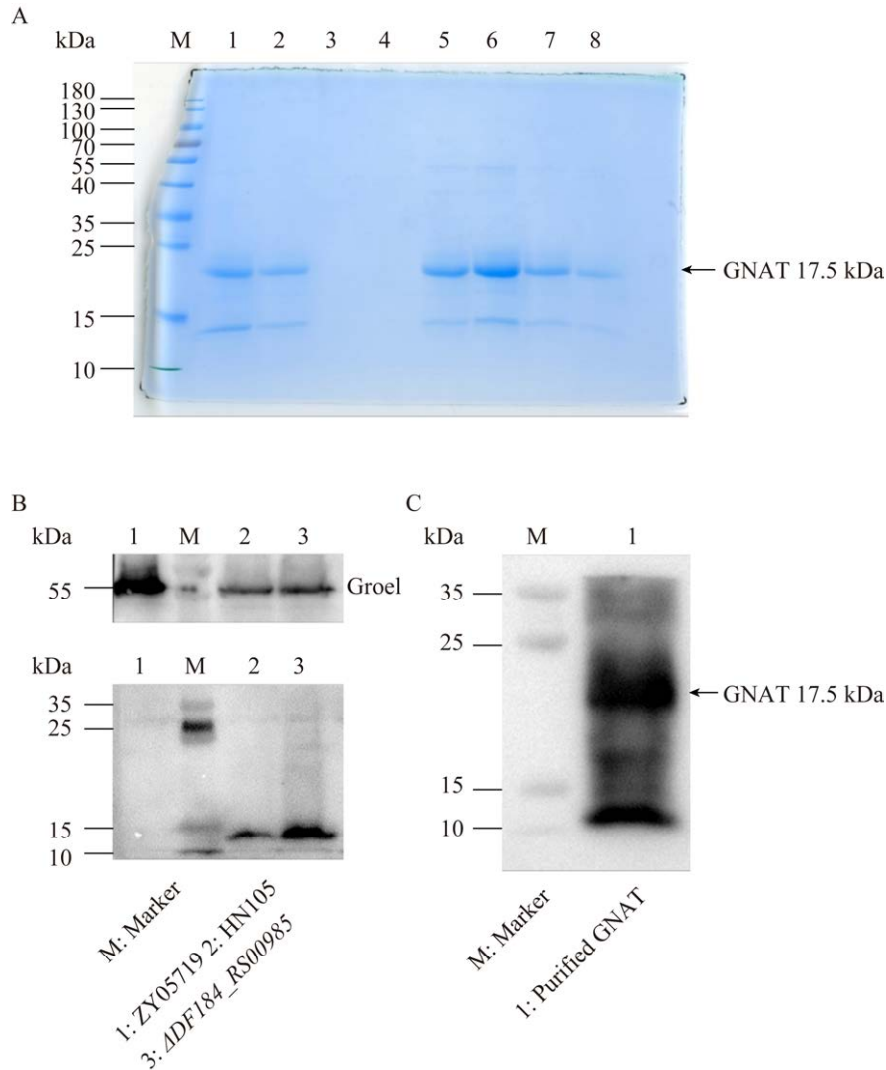


图 3 SsGNAT 的纯化与 Western blotting 鉴定

Figure 3 Purification of SsGNAT and Western blotting detection. A: Purification of SsGNAT toxin. M: Marker, 1–8: Gradient elution. B: Western blotting to detect SsGNAT toxin in *S. suis*, Groel was used as loading control. C: Western blotting to detect purified SsGNAT toxin.

对人喉癌上皮细胞(Hep-2)和人脑微血管内皮细胞(HBMEC)的黏附能力均显著上升, 而抗毒素缺失株 $\Delta DF184_RS00985$ 的黏附能力与野生株相比无显著差异(图 4)。细胞黏附试验证明 SsGNAT 毒素可抑制猪链球菌的黏附能力。

2.5 SsGNAT 毒素对猪链球菌抗吞噬、胞内存活能力和生物被膜形成能力的影响

胞壁蛋白与肽聚糖在生物被膜的形成中起

关键的调节作用, 并且可能影响细菌抗吞噬细胞吞噬作用^[37-39]。因此本研究分析了 SsGNAT 毒素对猪链球菌抗吞噬、胞内存活能力与生物被膜形成能力的影响。结果显示, 与野生株相比, $\Delta DF184_RS00985$ 与 $\Delta DF184_RS00985$ 抗吞噬与胞内存活能力(图 5A、5B)与生物被膜形成能力(图 5C)均无显著差异, 提示该 TA 系统对猪链球菌生物被膜形成能力与抗吞噬与胞内存活能力无明显影响。

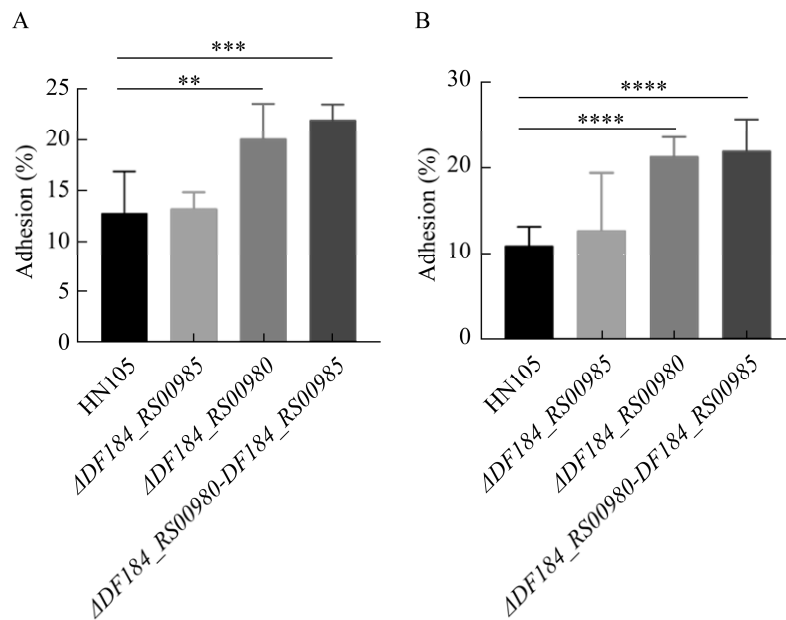


图 4 SsGNAT 毒素抑制猪链球菌对 HBMEC (A)、Hep-2 (B) 的黏附作用

Figure 4 SsGNAT toxin inhibits *Streptococcus suis* adhesion to HBMEC (A) and Hep-2 (B) cells. The error bars represent the standard deviation of at least three independent biological replicates. **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

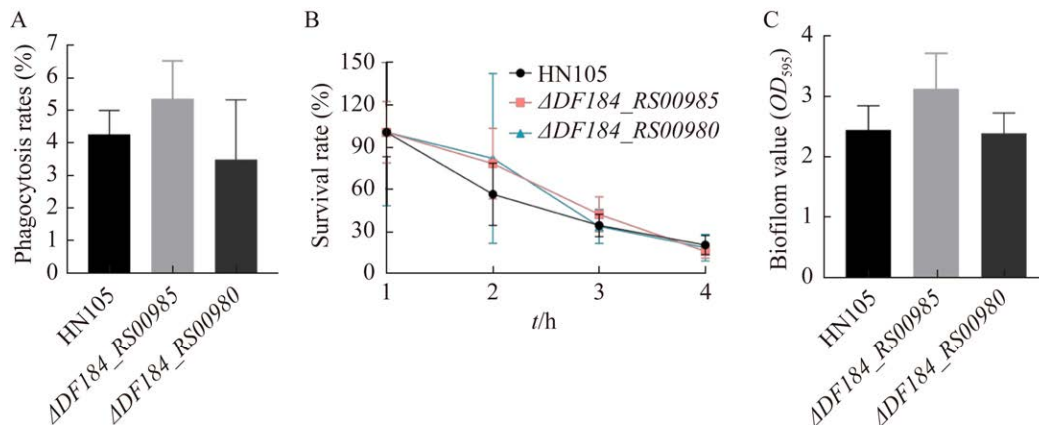


图 5 SsGNAT 毒素不影响猪链球菌生物被膜形成能力、抗吞噬和胞内存活能力

Figure 5 SsGNAT toxin has no effect on biofilm formation ability, anti-phagocytosis or intracellular survival ability in RAW 264.7 of *Streptococcus suis*. A: Phagocytosis rates in mouse macrophage RAW 264.7 of HN105, $\Delta DF184_RS00980$ and $\Delta DF184_RS00985$. B: Survival rates in mouse macrophage RAW 264.7 of HN105, $\Delta DF184_RS00980$ and $\Delta DF184_RS00985$. C: Biofilm formation of HN105, $\Delta DF184_RS00980$ and $\Delta DF184_RS00985$. The error bars represent the standard deviation of at least three independent biological replicates.

3 讨论与结论

TA 系统在细菌基因组中分布广泛且具有重要生物学功能^[16]。目前在猪链球菌中发现的II型 TA 系统有 SC84 中的 RelBE1、RelBE2、ParDE、yefM-yoeB, 05ZYH33 中的 SezAT, ZY05719 中的 Xress-MNTss^[17,40-43]。研究表明, yefM-yoeB 的缺失对 SC84 的毒力没有影响, 但 SezAT 可以促进与 05ZYH33 高致病性相关的毒力岛 SsP-1 的稳定性。Xress-MNTss 与猪链球菌对链霉素的耐药性与毒力有关。因此, 预测分析猪链球菌中的 TA 系统对研究猪链球菌的致病性、耐药性等多方面具有重要意义。

在II型 TA 系统中, 抗毒素与毒素是由同一个操纵子调控表达的, 抗毒素的 DNA 结合结构域可与 TA 系统的启动子结合从而抑制自身与毒素的转录活性, 也被称为自调控效应^[16,42]。这种模式可以使抗毒素降解后恢复毒素的转录活性, 快速产生大量毒素以对抗细菌所处的压力环境。有研究发现, 金黄色葡萄球菌的抗毒素 SavR 可以与启动子区域的回文序列结合抑制转录, 并且毒素-抗毒素复合物的形成可以增强这种结合^[44]。猪链球菌II型 TA 系统 Xress-MNTss 也具有自调控功能, 凝胶阻滞试验证明抗毒素 Xress、TA 复合物 Xress-MNTss 可以与该 TA 系统的启动子结合并且这种结合存在剂量依赖性^[17]。本研究发现抗毒素缺失株 $\Delta DF184_RS00985$ 中 SsGNAT 毒素的表达量显著增加, 提示抗毒素对毒素存在调控作用, 但 DF184_RS00980-DF184_RS00985 的自调控功能需要进一步验证。此外, 通过菌株组与纯化组 SsGNAT 的 Wesern blotting 检测发现, 菌株中的 SsGNAT 存在被切割的现象, 这提示猪链球菌中的 SsGNAT 可能需要通过切割才能发挥其生理功能。

现已发现的大多数II型毒素都为 RNA 酶,

通过降解菌体内的 RNA 抑制细菌生长。但本研究发现了猪链球菌中一个新的II型乙酰基转移酶毒素, 并且其乙酰化的底物与在革兰氏阴性菌中发现的乙酰基转移酶毒素可能不同。目前报道的革兰氏阴性菌乙酰基转移酶毒素-抗毒素系统中, GNAT 发挥毒性作用的机制为使氨酰 tRNA 乙酰化, 进而抑制蛋白质翻译^[33]。大肠杆菌的 ItaT 毒素通过乙酰化异亮氨酰 tRNA 阻断翻译并抑制细菌的生长^[34]; 肺炎克雷伯菌 KacT 毒素通过形成二聚体, 每个单体携带一个乙酰基团发挥阻断翻译的毒性作用, 其抗毒素 KacA 通过抑制有活性的 KacT 二聚体形成中和毒素的毒性^[26]。本研究发现, 猪链球菌 SsGNAT 毒素在大肠杆菌的周质间隙发挥毒性作用, 并且猪链球菌 SsGNAT 与目前鉴定的乙酰基转移酶毒素: 鼠伤寒沙门氏菌 TacT, 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 AtaT、AtaT2, 大肠杆菌 HS ItaT, 肺炎克雷伯菌 KacT, 弗氏志贺氏菌 GmvT 氨基酸序列一致性低、亲缘关系较远, 提示猪链球菌中 SsGNAT 毒素的作用机制可能不同。目前有研究表明, 一些II型毒素可以抑制细胞壁的合成。大肠杆菌 zeta 毒素 PezT 通过磷酸化肽聚糖抑制肽聚糖的合成最终导致细菌自溶, 并且 PezT 引起肺炎链球菌溶血素的产生可能会增加肺炎链球菌的毒力^[45]。因此推测猪链球菌 SsGNAT 乙酰化的底物不是 RNA, 而可能是肽聚糖或胞壁蛋白。

细菌对宿主细胞的黏附作用有利于细菌定殖和入侵^[46]。菌毛是大多数革兰氏阴性菌的重要黏附素, 研究发现, 猪链球菌致脑膜炎菌株 CZ130302 存在一种细菌表面向外延伸形成菌毛样结构的蛋白 SssP1, 可介导细菌的黏附作用。SssP1 可增强猪链球菌对 HBMEC 细胞的黏附, 是介导猪链球菌破坏血脑屏障致脑膜炎的一种重要蛋白^[47]。除此之外, 革兰氏阳性菌表面的

纤毛样物质、鞭毛蛋白等都可参与细菌的黏附过程。细胞壁磷壁酸在金黄色葡萄球菌黏附宿主上皮细胞中起重要作用^[48]。一些表面蛋白,如化脓链球菌的纤连蛋白结合蛋白、大肠杆菌的紧密素也有助于细菌黏附^[49-50]。猪链球菌 RNA 结合蛋白 RbpA 通过调控谷氨酰胺代谢相关蛋白 GlnQ、菌毛相关蛋白 StrF 与 SBP2 等参与细菌的黏附,并且影响细菌的毒力^[47]。本研究发现, SsGNAT 毒素可调节猪链球菌对 Hep-2 与 HBMEC 的黏附,这可能提示了一种新的影响猪链球菌黏附作用的机制。

基于以上发现,本研究提出了猪链球菌II型毒素-抗毒素系统 SsMarR-SsGNAT 中乙酰基转移酶毒素 SsGNAT 发挥毒性作用的模型(图 6)。在非应激条件下, SsGNAT 与对应的抗毒素结合以中和 SsGNAT 的毒性。当细菌处于压力状态下,不稳定的抗毒素被蛋白酶水解, SsGNAT 在周质间隙发挥毒性作用。同时, SsGNAT 的积累可降低细菌的黏附功能。但 SsGNAT 乙酰化的底物、该 TA 系统的自调控功能、SsGNAT 在菌体内的切割现象以及 SsGNAT 影响猪链球菌黏附功能的机制仍需进一步探究。

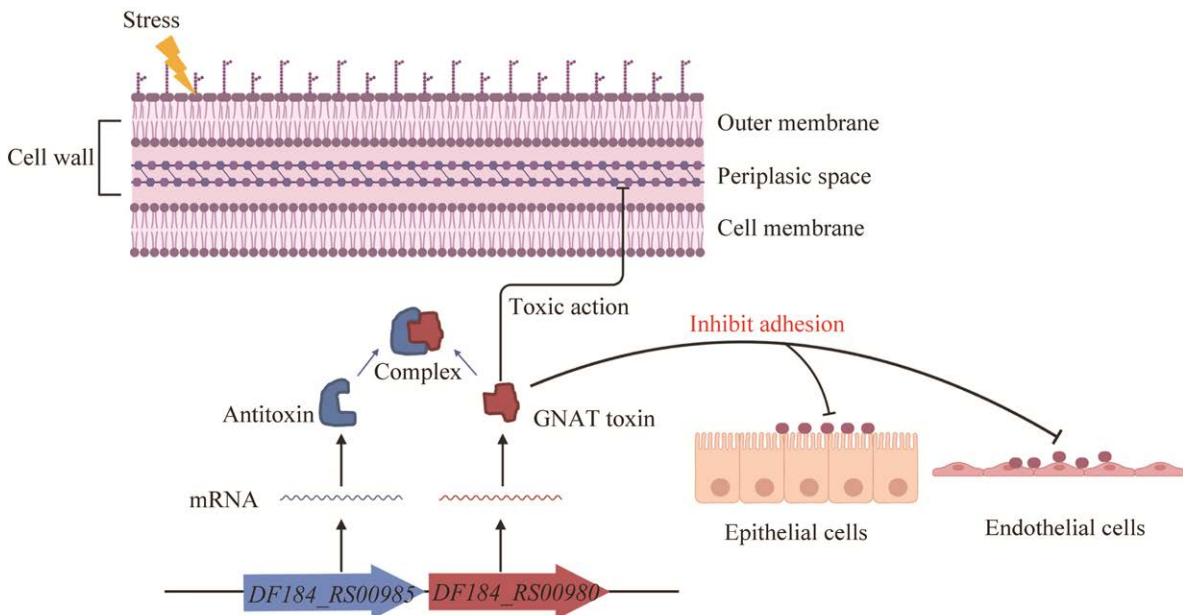


图 6 SsGNAT 毒素的毒性作用及其对猪链球菌黏附能力的影响模式图

Figure 6 Model diagram of toxicity of SsGNAT toxin and its effect on adhesion of *Streptococcus suis*.

参考文献

- [1] GOTTSCHALK M, XU JG, CALZAS C, SEGURA M. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen?[J]. *Future Microbiology*, 2010, 5(3): 371-391.
- [2] 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(6): e45.
- [3] FENG YJ, ZHANG HM, WU ZW, WANG SH, CAO M, HU D, WANG CJ. *Streptococcus suis* infection: an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases?[J]. *Virulence*, 2014, 5(4): 477-497.
- [4] TANG JQ, WANG CJ, FENG YJ, YANG WZ, SONG HD, CHEN ZH, YU HJ, PAN XZ, ZHOU XJ, WANG HR, WU B, WANG HL, ZHAO HM, LIN Y, YUE JH, WU ZQ, HE XW, GAO F, KHAN AH, WANG J, et al.

- Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *PLoS Medicine*, 2006, 3(5): e151.
- [5] FENG YJ, ZHANG HM, MA Y, GAO GF. Uncovering newly emerging variants of *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent[J]. *Trends in Microbiology*, 2010, 18(3): 124-131.
- [6] OKURA M, OSAKI M, NOMOTO R, ARAI S, OSAWA R, SEKIZAKI T, TAKAMATSU D. Current taxonomical situation of *Streptococcus suis*[J]. *Pathogens*, 2016, 5(3): 45.
- [7] PAN ZH, MA JL, DONG WY, SONG WC, WANG KC, LU CP, YAO HC. Novel variant serotype of *Streptococcus suis* isolated from piglets with meningitis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(3): 976-985.
- [8] QIU XT, BAI XM, LAN RT, ZHENG H, XU JG. Novel capsular polysaccharide loci and new diagnostic tools for high-throughput capsular gene typing in *Streptococcus suis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(24): 7102-7112.
- [9] HUANG JH, LIU X, CHEN H, CHEN L, GAO XP, PAN ZH, WANG J, LU CP, YAO HC, WANG LP, WU ZF. Identification of six novel capsular polysaccharide loci (NCL) from *Streptococcus suis* multidrug resistant non-typeable strains and the pathogenic characteristic of strains carrying new NCLs[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(2): 995-1003.
- [10] ZHENG H, QIU XT, ROY D, SEGURA M, DU PC, XU JG, GOTTSCHALK M. Genotyping and investigating capsular polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Canada[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 10.
- [11] ZHENG H, JI SB, LIU ZJ, LAN RT, HUANG Y, BAI XM, GOTTSCHALK M, XU JG. Eight novel capsular polysaccharide synthesis gene loci identified in nontypeable *Streptococcus suis* isolates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(12): 4111-4119.
- [12] YOSHIDA H, WADA T, TANIYAMA D, TAKAHASHI T. Draft genome sequence of clinical strain TANI1 of *Streptococcus suis* serotype 5 isolated from a bacteremia patient in Japan[J]. *Genome Announcements*, 2017, 5(18): e00260-17.
- [13] ZHU YC, ZHANG Y, MA JL, DONG WY, ZHONG XJ, PAN ZH, YAO HC. ICESsuHN105, a novel multiple antibiotic resistant ICE in *Streptococcus suis* serotype 5 strain HN105[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 274.
- [14] YAMAGUCHI Y, PARK JH, INOUE M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45: 61-79.
- [15] OGURA T, HIRAGA S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983, 80(15): 4784-4788.
- [16] LEPLAE R, GEERAERTS D, HALLEZ R, GUGLIELMINI J, DRÈZE P, van MELDEREN L. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(13): 5513-5525.
- [17] GU QB, HE PJ, WANG D, MA JL, ZHONG XJ, ZHU YC, ZHANG Y, BAI QK, PAN ZH, YAO HC. An auto-regulating type II toxin-antitoxin system modulates drug resistance and virulence in *Streptococcus suis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 671706.
- [18] SALA A, BORDES P, GENEVAUX P. Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Toxins*, 2014, 6(3): 1002-1020.
- [19] QI XY, BROTHERS KM, MA DZ, MANDELL JB, DONEGAN NP, CHEUNG AL, RICHARDSON AR, URISH KL. The *Staphylococcus aureus* toxin-antitoxin system YefM-YoeB is associated with antibiotic tolerance and extracellular dependent biofilm formation[J]. *Journal of Bone and Joint Infection*, 2021, 6(7): 241-253.
- [20] JURÉNAS D, FRAIKIN N, GOORMAGHTIGH F, van MELDEREN L. Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(6): 335-350.
- [21] FRAIKIN N, GOORMAGHTIGH F, van MELDEREN L. Type II toxin-antitoxin systems: evolution and revolutions[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(7): e00763-19.
- [22] HARMS A, MAISONNEUVE E, GERDES K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure[J]. *Science*, 2016, 354(6318): aaf4268.
- [23] TSILIBARIS V, MAENHAUT-MICHEL G, MINE N, van MELDEREN L. What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome?[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(17): 6101-6108.
- [24] HU LI, LIMA BP, WOLFE AJ. Bacterial protein acetylation: the dawning of a new age[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(1): 15-21.

- [25] VETTING MW, S de CARVALHO LP, YU M, HEGDE SS, MAGNET S, RODERICK SL, BLANCHARD JS. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 433(1): 212-226.
- [26] QIAN HL, YU H, LI PF, ZHU E, YAO QQ, TAI C, DENG ZX, GERDES K, HE XY, GAN JH, OU HY. Toxin-antitoxin operon *kacAT* of *Klebsiella pneumoniae* is regulated by conditional cooperativity via a W-shaped KacA-KacT complex[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(14): 7690-7702.
- [27] CHEVERTON AM, GOLLAN B, PRZYDACZ M, WONG CT, MYLONA A, HARE SA, HELAINE S. A *Salmonella* toxin promotes persister formation through acetylation of tRNA[J]. Molecular Cell, 2016, 63(1): 86-96.
- [28] JURÉNAS D, CHATTERJEE S, KONIJNENBERG A, SOBOTT F, DROOGMANS L, GARCIA-PINO A, van MELDEREN L. AtaT blocks translation initiation by N-acetylation of the initiator tRNA^{fMet}[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(6): 640-646.
- [29] YU HJ, JING HQ, CHEN ZH, ZHENG H, ZHU XP, WANG H, WANG SW, LIU LG, ZU RQ, LUO LZ, XIANG NJ, LIU HL, LIU XC, SHU YL, LEE SS, CHUANG SK, WANG Y, XU JG, YANG WZ. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2006, 12(6): 914-920.
- [30] ZHU YC, DONG WY, MA JL, ZHANG Y, PAN ZH, YAO HC. Utilization of the ComRS system for the rapid markerless deletion of chromosomal genes in *Streptococcus suis*[J]. Future Microbiology, 2019, 14: 207-222.
- [31] ZHONG XJ, MA JL, BAI QK, ZHU YC, ZHANG Y, GU QB, PAN ZH, LIU GJ, WU ZF, YAO HC. Identification of the RNA-binding domain-containing protein RbpA that acts as a global regulator of the pathogenicity of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Virulence, 2022, 13(1): 1304-1314.
- [32] ZHONG XJ, ZHANG Y, ZHU YC, DONG WY, MA JL, PAN ZH, YAO HC. Identification of an autorepressing two-component signaling system that modulates virulence in *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Infection and Immunity, 2019, 87(9): e00377-19.
- [33] JURÉNAS D, GARCIA-PINO A, van MELDEREN L. Novel toxins from type II toxin-antitoxin systems with acetyltransferase activity[J]. Plasmid, 2017, 93: 30-35.
- [34] WILCOX B, OSTERMAN I, SEREBRYAKOVA M, LUKYANOV D, KOMAROVA E, GOLLAN B, MOROZOVA N, WOLF YI, MAKAROVA KS, HELAINE S, SERGIEV P, DUBILEY S, BORUKHOV S, SEVERINOV K. *Escherichia coli* ItaT is a type II toxin that inhibits translation by acetylating isoleucyl-tRNA^{Ile}[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(15): 7873-7885.
- [35] QIAN HL, YAO QQ, TAI C, DENG ZX, GAN JH, OU HY. Identification and characterization of acetyltransferase-type toxin-antitoxin locus in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Molecular Microbiology, 2018, 108(4): 336-349.
- [36] KOUKI A, PIETERS RJ, NILSSON UJ, LOIMARANTA V, FINNE J, HAATAJA S. Bacterial adhesion of *Streptococcus suis* to host cells and its inhibition by carbohydrate ligands[J]. Biology, 2013, 2(3): 918-935.
- [37] FOSTER TJ, GEOGHEGAN JA, GANESH VK, HÖÖK M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12(1): 49-62.
- [38] MARTINEZ-GIL M, GOH KGK, RACKAITYTE E, SAKAMOTO C, AUDRAIN B, MORIEL DG, TOTSIKA M, GHIGO JM, SCHEMBRI MA, BELOIN C. YeeJ is an inverse autotransporter from *Escherichia coli* that binds to peptidoglycan and promotes biofilm formation[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 11326.
- [39] XU B, ZHANG P, LI WY, LIU R, TANG JS, FAN HJ. *hsdS*, belonging to the type I restriction-modification system, contributes to the *Streptococcus suis* serotype 2 survival ability in phagocytes[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1524.
- [40] YAO XY, CHEN T, SHEN XD, ZHAO Y, WANG M, RAO XC, YIN SP, WANG J, GONG YL, LU SG, LE S, TAN YL, TANG JQ, FUQUAN H, LI M. The chromosomal SezAT toxin-antitoxin system promotes the maintenance of the SsPI-1 pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis*[J]. Molecular Microbiology, 2015, 98(2): 243-257.
- [41] ZHENG CK, XU JL, REN SJ, LI JQ, XIA MM, CHEN HC, BEI WC. Identification and characterization of the chromosomal yefM-yoeB toxin-antitoxin system of *Streptococcus suis*[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 13125.
- [42] YANG QE, WALSH TR. Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(3): 343-353.

- [43] XU JL, ZHANG N, CAO MM, REN SJ, ZENG T, QIN ML, ZHAO XG, YUAN FY, CHEN HC, BEI WC. Identification of three type II toxin-antitoxin systems in *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Toxins*, 2018, 10(11): 467.
- [44] WEN W, LIU BH, XUE L, ZHU ZL, NIU LW, SUN BL. Autoregulation and virulence control by the toxin-antitoxin system SavRS in *Staphylococcus aureus*[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(5): e00032-18.
- [45] MUTSCHLER H, GEBHARDT M, SHOEMAN RL, MEINHART A. A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis[J]. *PLoS Biology*, 2011, 9(3): e1001033.
- [46] KLINE KA, FÄLKER S, DAHLBERG S, NORMARK S, HENRIQUES-NORMARK B. Bacterial adhesins in host-microbe interactions[J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 5(6): 580-592.
- [47] PAN ZH, HE PJ, ZHANG Y, GU QB, CHEN SS, YU Y, SHAO J, WANG KC, WU ZF, YAO HC, MA JL. SssP1, a *Fimbria*-like component of *Streptococcus suis*, binds to the vimentin of host cells and contributes to bacterial meningitis[J]. *PLoS Pathogens*, 2022, 18(7): e1010710.
- [48] BURIAN M, RAUTENBERG M, KOHLER T, FRITZ M, KRISMER B, UNGER C, HOFFMANN WH, PESCHEL A, WOLZ C, GOERKE C. Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of *Staphylococcus aureus* nasal colonization[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2010, 201(9): 1414-1421.
- [49] KREIKEMEYER B, OEHMCKE S, NAKATA M, HOFFFROGGE R, PODBIELSKI A. *Streptococcus pyogenes* fibronectin-binding protein F2: expression profile, binding characteristics, and impact on eukaryotic cell interactions[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(16): 15850-15859.
- [50] BATCHELOR M, PRASANNAN S, DANIELL S, REECE S, CONNERTON I, BLOOMBERG G, DOUGAN G, FRANKEL G, MATTHEWS S. Structural basis for recognition of the translocated intimin receptor (Tir) by intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(11): 2452-2464.