

研究报告

热休克蛋白 100 家族 ClpL 对猪链球菌 2 型应激和致病性的影响

祝昊丹, 王锐, 周俊明, 王丹丹, 胡屹屹, 倪艳秀, 李彬*

江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014

祝昊丹, 王锐, 周俊明, 王丹丹, 胡屹屹, 倪艳秀, 李彬. 热休克蛋白 100 家族 ClpL 对猪链球菌 2 型应激和致病性的影响[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 668-678.

ZHU Haodan, WANG Rui, ZHOU Junming, WANG Dandan, HU Yiyi, NI Yanxiu, LI Bin. Contributions of HSP100/ClpL to the stress tolerance and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 668-678.

摘要:【背景】酪蛋白水解蛋白酶 L (caseinolytic protease L, ClpL)是热休克蛋白 100 (heat shock protein 100, HSP100)家族成员, 参与多种细胞内生物学过程包括应激耐受反应、长期存活、毒力和抗生素抗性等, 在病原菌的致病过程中发挥重要作用。【目的】阐明 HSP100/ClpL 对猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis* type 2)强毒株的应激耐受和毒力的影响。【方法】利用温敏自杀质粒 pSET4s 构建了 SsClpL 基因缺失株 $\Delta clpL$; 利用大肠杆菌-猪链球菌穿梭质粒 pSET2 构建了互补株 C $\Delta clpL$; 比较亲本株 SS2-1、 $\Delta clpL$ 和 C $\Delta clpL$ 在各种应激环境(高温、氧化性应激和酸应激)和血液中的生存能力; 利用小鼠感染模型和体内竞争试验评价 *clpL* 缺失前后细菌的毒力变化。【结果】*clpL* 缺失后, SS2 在各种应激环境中的生存能力明显减弱; 同时在猪全血中的存活能力也显著降低; 对 BALB/c 小鼠的致病力有所降低, 在体内的定殖能力明显降低。【结论】SsClpL 与猪链球菌的应激耐受和致病性密切相关。

关键词: 猪链球菌 2 型; 热休克蛋白 100 家族 ClpL; 应激耐受; 致病性

资助项目: 国家自然科学基金(31302114); 河北省省级科技计划(21322401D)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31302114), and the Science and Technology Program of Hebei Province (21322401D).

*Corresponding author. E-mail: libinana@126.com

Received: 2024-08-30; Accepted: 2024-10-29; Published online: 2024-12-24

Contributions of HSP100/ClpL to the stress tolerance and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2

ZHU Haodan, WANG Rui, ZHOU Junming, WANG Dandan, HU Yiyi, NI Yanxiu, LI Bin*

Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Caseinolytic protease L (ClpL), a member of the heat shock protein (HSP) 100 family, is involved in various cellular processes, such as the stress tolerance response, long-term survival, virulence, and antibiotic resistance, playing important roles in the infection of pathogenic bacteria. **[Objective]** The present study aimed to elucidate the contributions of HSP100/ClpL to the stress tolerance and virulence of *Streptococcus suis* type 2. **[Methods]** We used the thermo-sensitive suicide vector pSET4s and the *Escherichia coli-Streptococcus suis* shuttle vector pSET2 to construct an isogenic *clpL* mutant strain ($\Delta clpL$) and a complemented strain ($C\Delta clpL$), respectively. We then compared the growth characteristics of the wild-type strain SS2-1, $\Delta clpL$, and $C\Delta clpL$ under various stress conditions (including high temperature, acidic environment, and oxidative stress) *in vitro* and in pig whole blood. Furthermore, we employed a mouse model of infection and challenged mice with SS2-1+ $\Delta clpL$ or SS2-1+ $C\Delta clpL$ to compare the virulence of SS2-1, $\Delta clpL$, and $C\Delta clpL$. **[Results]** The mutant strain $\Delta clpL$ showed reduced survival rates under stress conditions and in pig whole blood. In addition, it showed attenuated virulence in BalB/C mice. Furthermore, $\Delta clpL$ had significantly lower colonization ability than SS2-1 in mice. **[Conclusion]** The data indicate that the SsClpL is involved in the stress response and pathogenicity of SS2.

Keywords: *Streptococcus suis* type 2; heat shock protein 100 family member ClpL; stress tolerance; pathogenicity

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是引起猪链球菌病的主要病原,也是一种重要的人兽共患病原菌。猪链球菌血清型众多,依据荚膜多糖抗原性差异,分为 29 个经典荚膜血清型(1-27、29 和 1/2)^[1]和 27 个新型荚膜基因簇(NCL1-26 和 ChZ)^[2-3],其中以血清 2 型(*Streptococcus suis* type 2, SS2)分离率最高、致病性最强、危害最严重^[1]。猪链球菌不仅引起猪的脑膜炎、败血症、关节炎、肺炎及急性死亡;也可导致人的脑膜炎、中毒休克综合征及死亡^[4]。猪链球菌不仅给全球养猪业造成重大的经济损失,也给公共卫生和食品安全带来严重威胁^[1]。

对致病菌而言,蛋白酶一直被认为是重要的毒力因子^[5]。酪蛋白水解蛋白酶(caseinolytic protease, Clp)是一类广泛存在于原核生物和真核生物体内的蛋白质质量控制系统—AAA+蛋白酶^[6],由含有丝氨酸蛋白酶催化三联体结构域(Ser-His-Asp)的 ClpP 蛋白酶和 HSP100 (heat shock proteins, HSP100)/Clp ATP 酶分子伴侣家族成员(如 ClpA、ClpB、ClpC、ClpE、ClpL 和 ClpX 等)组成^[6]。ClpP 与 Clp ATP 酶结合形成具有蛋白酶水解活性的 Clp 功能复合体(如 ClpAP、ClpCP、ClpEP 和 ClpXP)对底物进行特异性地识别和降解^[6],清除细胞内积累的和错

误折叠的蛋白质,维持细胞内的正常生理活动和代谢,以及压力刺激下的蛋白质动态平衡^[6-7]; Clp蛋白酶系统能够稳定一些转录调控因子的蛋白稳定性,进而间接调控下游相关基因和蛋白表达,在转录、翻译及翻译后等多层级对细菌进行调控,从而提高细菌在环境中的生存能力及对宿主致病力^[6-8]。

在链球菌属的变异链球菌(*Streptococcus mutans*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)和无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)等种内均发现有 Clp 蛋白酶系统,参与调控细菌的生长、代谢、应激耐受、生物被膜及毒力等^[9-11]。肺炎链球菌的 *clpP* 基因缺失导致细菌在小鼠体内无法定殖^[12]; 应激相关蛋白、核酸及蛋白质代谢等基因表达显著下调^[13]; ClpC 是肺炎链球菌释放自溶素 LytA 和溶血素 Ply 的必需蛋白,促进细菌在肺组织和血液里的存活^[14]。变异链球菌的 ClpP 和 ClpX 影响细菌的生长、自溶、酸性环境下的存活^[15]。前期研究表明猪链球菌强毒株 SS2-1 的基因组(GenBank CP018908.1)中含有 4 个 Clp ATP 酶即 SsClpL (BVD85-01820, AVW21342.1)、SsClpE (BVD85-02290, AVW21431.1)、SsClpX (BVD85-03910, AVW21723.1) 和 SsClpC (BVD85-09325, AVW22740.1), 以及 1 个 ClpP 肽酶 SsClpP (BVD85-07310, AVW22357.1)^[16]。Roy 等^[17]研究表明 ClpX 和 ClpP 在 SS2 强毒株 ZY05719 的致病过程中发挥重要作用。本研究拟对猪链球菌强毒株 SS2-1 中的 SsClpL 的编码基因 *clpL* 进行敲除,比较 *clpL* 缺失前后细菌的生长特性、菌株形态、应激环境和血液中的存活能力、动物致病性及体内的定殖能力,以期阐明 SsClpL 对猪链球菌的应激耐受和毒力的影响。

1 材料与方 法

1.1 样 品

猪链球菌 2 型强毒株 SS2-1 于 1998 年分离自江苏患病猪体,质粒 pSET4s、pSET2 和 SS2 阳性猪血清,本实验室保存^[18]。本研究所用 Balb/C 小鼠(4-5 周龄,雌性)购自扬州大学实验动物中心。动物实验(包括小鼠攻毒试验和采集健康仔猪血液)经过江苏省农业科学院实验动物伦理委员会审批(SYXK 苏 2015-0019)。

1.2 培养基

Todd-Hewitt broth (THB)培养基和 THY 培养基(THB 培养基中添加 2%的酵母提取物)参考文献^[19]配制; LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Sph* I、*Sal* I、*Pst* I、*Bam* H I、*Eco*R I, 以及高保真 PrimeSTAR DNA 聚合酶试剂盒、T4 DNA 连接酶、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒, Omega 公司;同源重组连接酶,南京诺唯赞生物科技有限公司;氯霉素(chloramphenicol, Cm)和壮观霉素(spectinomycin, Spc),北京索莱宝科技有限公司。PCR 扩增仪、台式冷冻离心机和分光光度计, Eppendorf 公司;凝胶成像系统,上海天能生命科学有限公司;显微镜,奥林巴斯(中国)有限公司; MP FastPrep-24 组织研磨仪, MP 公司。本研究所用引物均由南京擎科生物科技有限公司合成(表 1)。

1.4 SsClpL 基因缺失株和互补株的构建

参考 Ju 等^[20]的研究方法,以细菌 DNA 提取试剂盒提取的菌株 SS2-1 的基因组 DNA 为模板,利用 PrimeSTAR DNA 聚合酶试剂盒和引物 L1/L2、R1/R2 分别扩增 *clpL* 基因上、下游

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer	Primer sequence (5'→3')	Function
L1	ACCC <u>AAGCTT</u> TGCTAAGGAAAACCAAGAGG	Amplification of the upstream
L2	ACGCG <u>TCGAC</u> TACCTAGCCTCCTCCGTA	border of <i>clpL</i>
R1	GCGC <u>GGATCC</u> AAGATGAATAAGGTTGGGG	Amplification of the
R2	ACCG <u>GAATTC</u> ACCCAGGAACTTACTCG	downstream border of <i>clpL</i>
cat1	ACGCG <u>TCGAC</u> CACCGAACTAGAGCTTGATG	Amplification of <i>cat^R</i> gene
cat2	GCGC <u>GGATCC</u> TAATTCGATGGGTTCCGAGG	cassette
in1	TTTAACAATATGGACGACA	An internal fragment of <i>clpL</i>
in2	CCCACGGGATAAAGCTGGTT	
out1	CAAAGGTCTGGACGCCAG	Outside homologues region of
out2	ATCGGGACTATTGACCGCT	<i>clpL</i>
C1	gttgtaaacgacgcccagtg <u>aattc</u> AGGACTTGCAGGACACTT	Amplification of SsClpL ORF
C2	attacgccaagcttgcatgc <u>ctgcag</u> CTGCCAGTAGGTTTGCTT	and its promoter fragment
spc1	GTTTGGATCAGGAGTTGAGAG	Identification of spectinomycin
spc2	CCAAGATAACTACGAAGCTGCTA	gene

带有下划线的碱基为限制性酶切位点。

Underlined nucleotides denote enzyme restriction sites.

同源臂基因序列 *up* 和 *dn*; 以质粒提取试剂盒提取的 pR326 质粒为模板, 利用 PrimeSTAR DNA 聚合酶试剂盒和引物 cat1/cat2 扩增氯霉素抗性基因盒 *cat* 序列(表 1)。PCR 反应体系 (50 μ L): 2 \times PrimeSTAR Premix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。胶回收试剂盒纯化 *up*、*dn* 和 *cat* 这 3 个基因片段的 PCR 产物, 将纯化的 DNA 片段分别用 *Sph* I/*Sal* I、*Sal* I/*Bam*H I 和 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切后试剂盒回收, 以 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接 3 个 DNA 片段的连接产物为 PCR 模板, 以 L1/R2 为引物扩增 *up-cat-dn* 基因片段; 同样 50 μ L 的 PCR 扩增体系, 反应条件有所不同, 具体为: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 利用胶回收试剂盒纯化同源重组基因片段 *up-cat-dn*; 以 *Sph* I/*Eco*R I 分别双酶切 *up-cat-dn* 和温敏质粒 pSET4s, 纯化后利用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接基因片段

up-cat-dn 和质粒 pSET4s, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含有壮观霉素 (100 μ g/mL) 和氯霉素 (8 μ g/mL) 双抗性的 LB 平板 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑单克隆, PCR 检测阳性后送南京擎科生物科技有限公司测序。测序确认无误后将重组质粒 pSET4s Δ *clpL* 电转化于 SS2-1 感受态细胞, 在含壮观霉素 (100 μ g/mL) 和氯霉素 (4 μ g/mL) 双抗性的 THY 培养基中 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养, 待细菌生长起来后转移到 37 $^{\circ}$ C 培养 4–6 h, 涂布氯霉素 (4 μ g/mL) 抗性的 THY 平板, 次日挑取单菌落于 THB 液体培养 8 h, 用细菌 DNA 提取试剂盒提取各菌株基因组 DNA, 用 in1/in2 和 cat1/cat2 引物进行初步筛选, 获得候选缺失株; 利用引物 cat1/out2 和 out1/cat2 进行交叉 PCR 进一步验证候选缺失株, 最终获得基因缺失株 Δ *clpL*。用于检测的 PCR 反应体系 (20 μ L): 2 \times PrimeSTAR Premix 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s 或 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

以 SS2-1 基因组 DNA 为模板, 利用 Primer STAR DNA 聚合酶试剂盒和引物 C1/C2 扩增 SsClpL 编码区及其上游启动子序列, PCR 扩增体系及条件同 *up-cat-dn* 基因片段的扩增。纯化的 PCR 产物与经 *EcoR* I/*Pst* I 双酶切回收的质粒 pSET2 利用同源重组酶试剂盒进行连接, 构建重组表达质粒 pSET2-C Δ clpL, 将其电转化至基因缺失株 Δ clpL 的感受态细胞中, 37 °C、180 r/min 振荡培养 2 h 后涂于壮观霉素(100 μ g/mL)抗性 THY 平板过夜, 挑取单菌落, 分别利用引物 in1/in2 和 spc1/spc2 进行 PCR 鉴定, 获得互补株 C Δ clpL^[20], PCR 反应体系和条件与基因缺失株的鉴定相同。

1.5 生长特性分析

分别挑取亲本株 SS2-1、缺失株 Δ clpL 和互补株 C Δ clpL 的单菌落, 接种到 5 mL THB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜, 将各菌株培养液的浓度调整到 OD_{600} 为 1.0 后, 取 1 mL 菌液接种至 100 mL THB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养。以未接种细菌的 THB 液体培养基为空白对照, 无菌条件下取 1 mL 菌液, 每隔 1 h 用分光光度计测量培养物在 600 nm 波长下的 OD 值, 连续测量 10 h, 绘制生长曲线^[21]。

将对数生长中后期(OD_{600} 为 0.6–0.8)的各 SS2 菌液于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 后收集菌体, PBS 洗涤 2 次, 取 5 μ L 菌液于载玻片上固定后进行革兰染色, 油镜下观察细菌的形态。

1.6 应激耐受试验

对数生长中后期的 SS2 亲本株 SS2-1、缺失株 Δ clpL 和互补株 C Δ clpL 的培养物于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 后收集菌体, 无菌 1×PBS 调整菌液 OD_{600} 值为 0.2, 参考 Li 等^[22]的方法略作修改进行如下应激耐受试验。热应激: 取 100 μ L 菌加入含有 900 μ L PBS 的 1.5 mL 离心管后, 放进 42 °C 水浴锅中热应激 1 h; 氧化性

应激: 100 μ L 菌加入含有终浓度为 30 mmol/L H_2O_2 的 900 μ L PBS 于 1.5 mL 离心管中, 37 °C 作用 30 min, 加入过氧化氢酶(5 mg/mL)终止反应; 酸应激: 100 μ L 菌加入含有 900 μ L 酸性 PBS (pH 5.5)的 1.5 mL 离心管中, 37 °C 作用 1 h; 以未作任何处理的细菌为对照组, 37 °C 分别培养 1 h 或者 30 min; 各 SS2 菌液 10 倍比稀释后涂布于 THY 平板计数, 比较应激前后各 SS2 菌株的存活率。

1.7 仔猪全血存活试验

参考 Bonifait 等^[23]的方法略作修改, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集对数生长期的 SS2-1、 Δ clpL 和 C Δ clpL, PBS 洗涤后重悬菌体并调整各菌液浓度至 1×10^7 CFU/mL。将 100 μ L 的 SS2 菌液和 100 μ L SS2 阳性猪血清加入到含有 800 μ L 新鲜抗凝猪血中, 轻柔混匀后 37 °C 孵育 2 h, 其间多次颠倒防止血液凝固。THY 平板分别计数 0 h 和 2 h 的各 SS2 菌落, 并计算存活率。

1.8 小鼠致病性试验

挑取 SS2 单菌落接种于 THB 培养基中 37 °C、180 r/min 培养过夜后按 1%接种量转接于预热 THB 中, 待生长到对数中后期(OD_{600} 为 0.6–0.8)时, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, PBS 洗涤 2 次, THB 调整 SS2 浓度到 4.0×10^7 CFU/mL。将 30 只 BALB/c 小鼠随机分为 3 组, 腹腔注射 1.0 mL 菌液; 另取 10 只小鼠作为对照组, 腹腔注射相同剂量的 THB 培养基。观察小鼠的发病及死亡情况, 每天 2 次, 直至攻毒后 7 d, 记录小鼠死亡情况。

参考 Tang 等^[24]的方法, 将 12 只 BALB/c 小鼠随机分成 2 组, 腹腔注射 1:1 等量混合的 SS2-1: Δ clpL 或 SS2-1:C Δ clpL 菌液, 注射剂量为 2×10^7 CFU/小鼠(各菌液量均为 1.0×10^7 CFU), 另取 3 只小鼠作为对照组, 腹腔注射相同体积的 THB 培养基。攻毒 20 h 后通过眼球采血方

式获取抗凝血,处死小鼠后分离脑和脾,称重后加入 1 mL 的无菌 PBS,MP FastPrep-24 组织研磨仪碎脏器,将脏器研磨液和血液样品等 10 倍比稀释后涂于 THY 平板或相应 THY 抗性平板,37 °C 培养 24 h 后进行菌落计数。竞争感染系数 (competition index, CI)=回收到的缺失株 CFU 或者互补株的 CFU/回收到的亲本株 CFU^[24]。

2 结果与分析

2.1 SsClpL 缺失株 $\Delta clpL$ 和互补株 $C\Delta clpL$ 的构建结果

自杀性质粒 pSET4s $\Delta clpL$ 电转进菌株 SS2-1 感受态细胞后,28 °C 于双抗性 THB 液体培养基中 180 r/min 振荡培养,质粒在菌株 SS2-1 中增殖后,转入 37 °C 致温敏质粒丢失,在氯霉素抗性平板上筛选得到 SsClpL 基因缺失株 $\Delta clpL$ 。首先利用 *clpL* 内部引物 in1/in2 和 cat1/cat2 进行初步筛选,而后在 *clpL* 上下游同源臂序列的外测设计 1 对引物 out1/out2,如图 1A 所示,以 out1/cat2 和 out2/cat1 组合进行交叉 PCR 鉴定。同源重组后,目的基因 *clpL* 将被抗性基因 *cat* 所取代,缺失株扩增不到 642 bp 的目的基因 *clpL*,但能扩增出 1 056 bp 的抗性基因 *cat*;交叉 PCR 验证缺失株将能分别得到 2 205 bp 和 2 428 bp 的目的条带;如图 1B 所示。壮观霉素和氯霉素双抗性 THY 平板上生长的单菌 $C\Delta clpL$ 用引物 in1/in2 和 spc1/spc2 可分别扩增出 642 bp 和 597 bp 的目的片段,说明互补株构建成功(图 1B)。

2.2 SsClpL 对细菌生长及形态的影响

在相同培养条件下,以培养时间为横坐标, OD_{600} 为纵坐标,绘制得到 SS2 各菌株的生长曲线如图 2A 所示,缺失株 $\Delta clpL$ 的早期生长速度稍慢于亲本株 SS2-1,但无显著差异。将对数生长中后期的 SS2 各菌株进行革兰染色,油镜观察发现与亲本株 SS2-1 和互补株 $C\Delta clpL$ 相比,

缺失株 $\Delta clpL$ 易形成长链(图 2B)。

2.3 SsClpL 参与 SS2 的应激耐受

SS2 在感染过程中会接触到各种应激因素,包括营养不良、温度升高、pH 变化、渗透压升高及来自巨噬细胞内的氧化性杀伤物质^[25]。本研究评价了 *clpL* 基因缺失对 SS2 在各种应激环境中存活的影响,结果表明缺失株 $\Delta clpL$ 在高温(42 °C)、 H_2O_2 (30 mmol/L)和酸性环境(pH 5.5)中的存活能力较亲本株 SS2-1 显著降低,对各种环境应激刺激的敏感性增加;互补株 $C\Delta clpL$ 的存活能力有所恢复(图 3)。应激耐受试验结果表明 SsClpL 的存在可增强 SS2 在应激环境中的存活能力。

2.4 SsClpL 参与 SS2 在血液中的存活

感染过程中 SS2 进入血液后存活并增殖是引起发病的最关键步骤^[25]。本研究评价了 SsClpL 缺失前后细菌在猪全血中的存活能力。以起始(0 h)混合物中的 SS2 菌数为 100%,孵育 2 h 的细菌计数与之相比,结果表明与亲本株 SS2-1 (存活率 52.4%)相比,缺失株 $\Delta clpL$ (存活率 19.8%)在全血中的存活率显著下降,互补株 $C\Delta clpL$ (存活率 34.0%)有所回升(图 4)。

2.5 SsClpL 参与 SS2 对小鼠的致病

采用 BALB/c 小鼠腹腔攻毒模型评估 SS2 各菌株的致病性,菌株 SS2-1 感染组小鼠在 SS2 攻毒后均出现典型的临床症状,如寒颤、毛糙、跛行和嗜睡等,第一天即死亡 4 只小鼠,3 d 内死亡小鼠 8 只(死亡率为 80%); $\Delta clpL$ 感染组仅有少量小鼠有类似的临床症状,大多数小鼠症状较轻,观察期内死亡 30%;而 $C\Delta clpL$ 组小鼠毒力有所上升,死亡率为 60%;对照组小鼠全部存活(图 5A)。

小鼠体内竞争感染试验表明 $\Delta clpL$ /SS2-1 感染组中缺失株 $\Delta clpL$ 脾脏的 CI 值为 0.113、脑组织为 0.068、血液为 0.102;而 $C\Delta clpL$ /SS2-1 感染组中互补株 $C\Delta clpL$ 的上述各组织 CI 值分

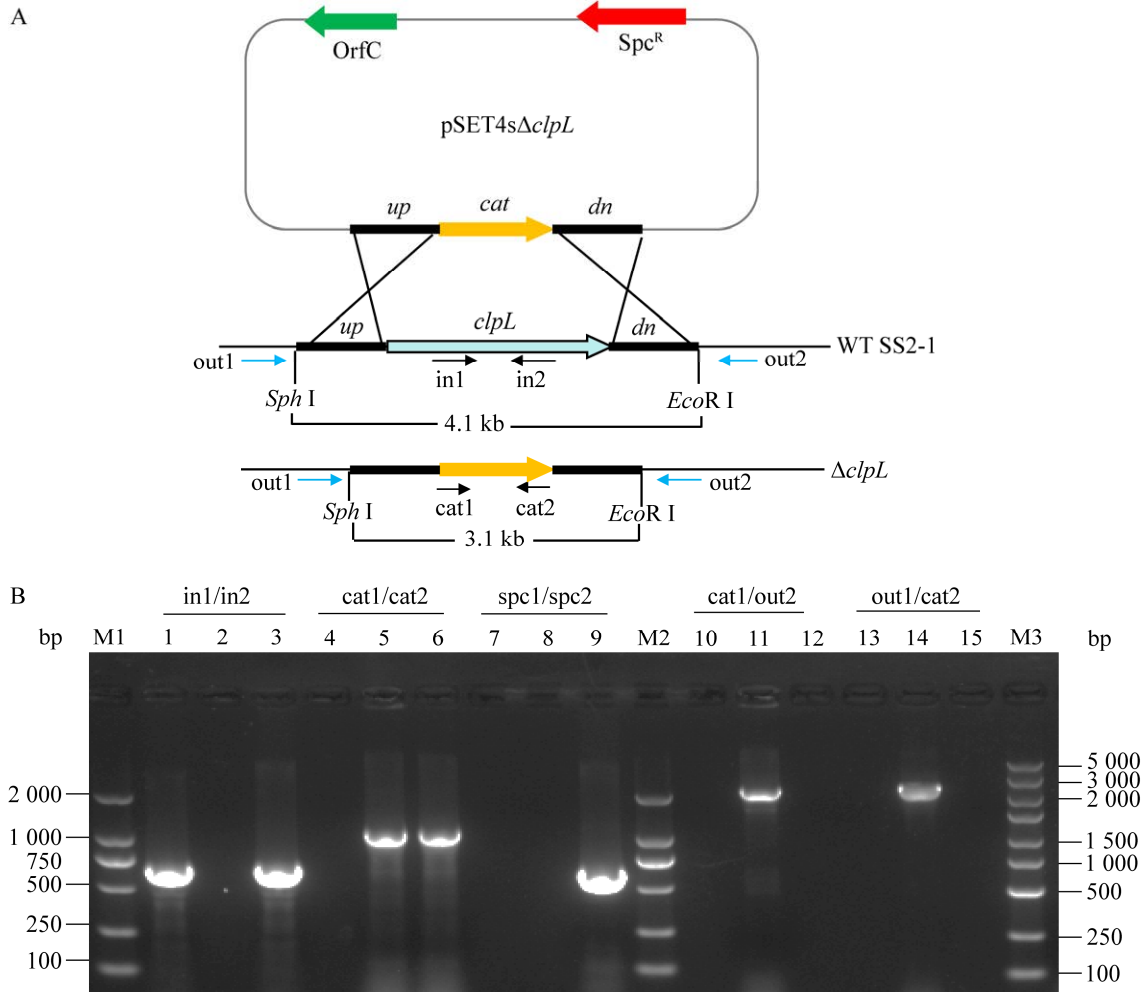


图1 *clpL* 基因缺失株构建和鉴定 A: *clpL* 基因缺失株构建示意图。B: 组合 PCR 鉴定 *clpL* 基因缺失株 Δ*clpL* 与互补株 CΔ*clpL*。M1、M2: DL2000 DNA Marker; 1、4、7、10、13: SS2-1; 2、5、8、11、14: Δ*clpL*; 3、6、9、12、15: CΔ*clpL*; M3: DL5000 DNA Marker。

Figure 1 Construction and confirmation of *clpL* knockout mutant strain. A: Strategy for deletion mutagenesis of the *clpL* mutant in *Streptococcus suis* virulent strain SS2-1. B: Multiplex PCR analysis of the mutant strain Δ*clpL* and the complemented strain CΔ*clpL*. M1, M2: DL2000 DNA Marker; 1, 4, 7, 10, 13: SS2-1; 2, 5, 8, 11, 14: Δ*clpL*; 3, 6, 9, 12, 15: CΔ*clpL*; M3: DL5000 DNA Marker.

别为 0.460、0.362 和 0.397 (图 5B); 说明 Δ*clpL* 在体内的定殖能力明显低于 SS2-1, 而 CΔ*clpL* 的定殖能力有所回复, 提示 SsClpL 可增强 SS2 对小鼠的致病能力。

3 讨论

在感染过程中, 细菌不可避免地遇到各种

刺激并会引起某些特定蛋白质的聚集和累积。为应对感染中恶劣的宿主体内环境, 细菌已经进化出多种精密的分子系统, 其中细菌伴侣蛋白系统起着重要的作用^[26]。分子伴侣蛋白对于细菌的存活尤其是应激环境中的存活至关重要^[27]。ClpL 是 HSP100/Clp ATP 酶超家族蛋白成员^[28], 迄今为止, 在革兰阳性菌中发现了超过 130 种

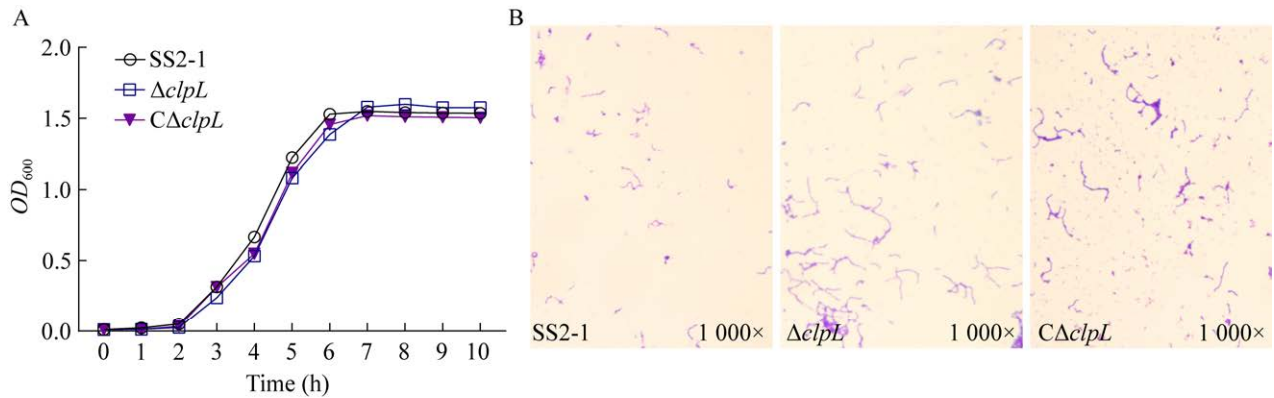


图 2 SsClpL 缺失对 SS2 生长及形态的影响 A: SS2-1、 $\Delta clpL$ 和 C $\Delta clpL$ 的生长曲线。B: 革兰染色观察 SS2 各菌株的形态。

Figure 2 The effects of SsClpL deficiencies on the growth and morphology of SS2. A: Growth curves of SS2-1, $\Delta clpL$ and C $\Delta clpL$. B: Light microscope morphology of SS2 strains using Gram staining.

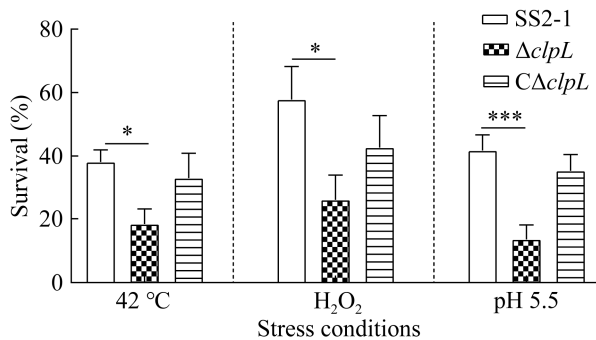


图 3 SsClpL 对 SS2 适应各种应激环境的影响
Figure 3 Contribution of SsClpL to the adaption of SS2 to various stress conditions. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

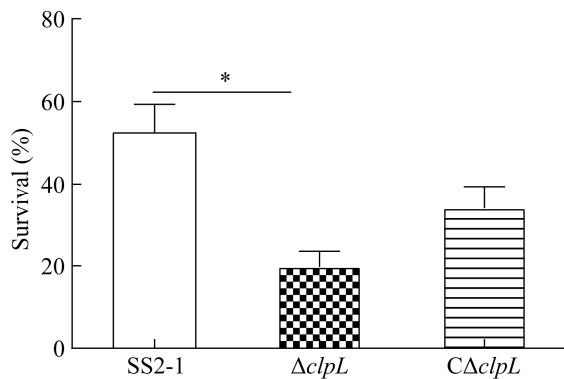


图 4 SsClpL 对 SS2 在猪全血中存活的影响
Figure 4 Contribution of SsClpL to survival of SS2 in pig whole blood. *: $P < 0.05$.

ClpL 同源蛋白质，包括金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、单核增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、链球菌属中的肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*)、变异链球菌 (*S. mutans*)、化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 和无乳链球菌 (*S. agalactiae*) 等，参与细菌的应激耐受、毒力及抗生素抗性^[29-33]，但是关于 ClpL 功能的具体分子机制研究相对较少。

肺炎链球菌 ClpL 是一种锰离子依赖的分子伴侣蛋白，无需其他伴侣蛋白如 DnaK 的协助独立发挥其分子伴侣的活性；ClpL 可稳定未折叠的蛋白质，防止热聚集，还可恢复一些热变性蛋白质的酶活性^[28]。ClpL 转录水平和蛋白表达水平均受到高温的诱导，受到 ClpP 的负调控；相较于亲本株，缺失株 $\Delta clpL$ 在高温环境中的生长被明显抑制^[10]。嗜热链球菌 (*S. thermophilus*) 的 ClpL 蛋白表达受到低温和高温的双重诱导，缺失株 $\Delta clpL$ 在高温环境中生存能力急剧降低，提示其参与细菌抵抗热应激^[11]。单核增生李斯特氏菌中质粒介导的 ClpL 转入到热敏感菌株后使其获得了抵抗超高温 (55 °C) 的能力^[34]。本研究中 SsClpL 表达缺失株 $\Delta clpL$

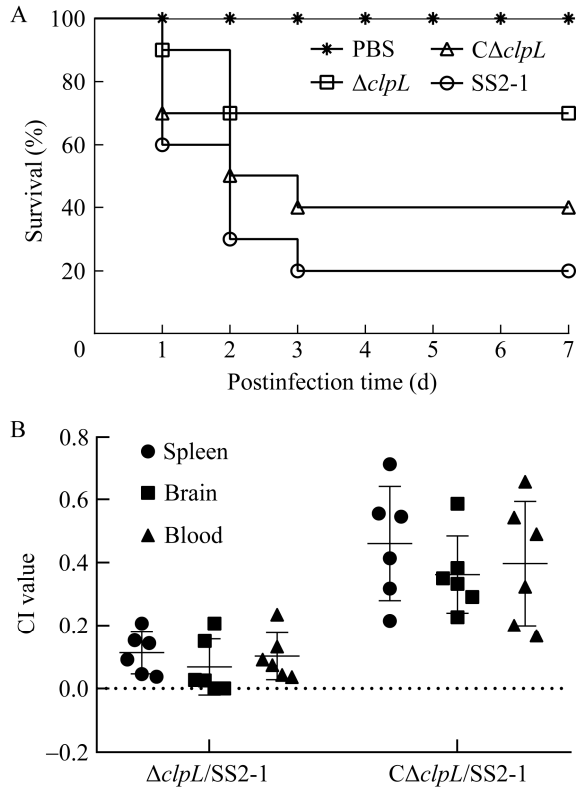


图5 BALB/c小鼠感染模型评价SsClpL对SS2毒力的影响 A: BALB/c小鼠攻毒存活曲线。B: 体内竞争感染试验评估缺失株 $\Delta clpL$ 在体内的定殖能力。

Figure 5 Contribution of SsClpL to the virulence of SS2 in BALB/c mice infection model. A: Survival curves for BALB/c mice in SS2 challenge assays. B: Competitive infection assay to evaluate the colonization of *clpL* of BALB/c mice in vivo.

在高温环境中的存活能力较亲本株 SS2-1 显著降低(图 3)。

变异链球菌的 *clpL* 基因缺失株 $\Delta clpL$ 在蔗糖环境中更容易形成生物被膜且对酸的杀伤更敏感^[15]。此外, ClpL 也是变异链球菌中应激调控因子 CtsR 正确折叠的必需因子^[29]。我们的研究显示猪链球菌的 ClpL 同样能够帮助 SS2 抵抗酸性杀伤, 缺失株 $\Delta clpL$ 在酸性环境中的存活能力降低。最近的研究表明肺炎链球菌的 ClpL 同样参与细菌氧化性应激, $\Delta clpL$ 对外源 H_2O_2

的敏感性显著提高, 并且 *clpL* 的表达受到转录因子 SirR 的调控^[35]。本研究的 H_2O_2 应激耐受试验结果表明 SsClpL 表达缺失使 SS2 对 H_2O_2 敏感性增加, 使其在氧化性应激环境中的生存能力降低(图 3)。此外, 猪全血存活试验中缺失株 $\Delta clpL$ 的存活能力显著降低, 提示 SsClpL 在 SS2 适应宿主的血液环境及抵抗免疫细胞的杀伤和清除过程中发挥着重要作用。在无乳链球菌的 HSP100/ClpB 研究中观察到了相似的结果^[32], *clpB* 基因缺失株 $\Delta clpB$ 在热应激和酸应激环境中的存活能力显著降低, 在罗非鱼全血杀菌试验中更容易被杀死^[32]。

HSP100 家族蛋白可影响细菌的生长、形态、代谢和毒力等^[7]。肺炎链球菌 HSP100/ClpC 表达缺陷株形成长链^[36]; 单核增生李斯特氏菌的 *clpC* 和 *clpE* 单基因缺失株的细胞形态无任何改变, 但 *clpC/clpE* 双基因缺失株的细菌分裂异常^[37]; 本研究中 HSP100/ClpL 基因缺失株也易形成长链状(图 2B)。单核增生李斯特氏菌的 HSP100/ClpE 基因敲除后, 小鼠的半数致死量 (lethal dose 50%, LD_{50}) 提高了 100 倍, 毒力显著减低; 此外, 缺失株在肝和脾中的细菌载量显著降低^[37]。本研究中 BALB/c 小鼠感染模型表明 SsClpL 表达缺失导致 SS2 的毒力降低; SS2-1/ $\Delta clpL$ 混合感染组的体内竞争试验结果显示小鼠的脾脏、脑组织和血液中回收到的缺失株 $\Delta clpL$ 菌落数明显低于亲本株, $\Delta clpL/SS2-1$ 的各 CI 值均低于 0.12, 而 $C\Delta clpL/SS2-1$ 的 CI 值接近 0.5 (图 5B), 表明质粒介导的互补株 $C\Delta clpL$ 的毒力有所恢复^[26]。在 SS2 超氧化物歧化酶 SodA 的研究中同样用竞争感染试验评估缺失株的毒力, 得到了相似的结论^[24]。

4 结论

本研究表明了猪链球菌 2 型的 HSP100/ClpL

参与细菌的应激耐受、体内存活及小鼠的致病性,然而 SsClpL 操纵细菌的应激耐受间接影响细菌的毒力和/或直接调控相关毒力因子的表达从而影响细菌毒力的具体分子机制,仍有待进一步深入研究。

致谢

感谢日本国家动物卫生研究所分子细菌学实验室的 Dr. Tsutomu Sekizaki 和 Dr. Daisuke Takamatsu 赠送 pSET4s 和 pSET2 质粒。

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(6): e45.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] GOTTSCHALK M, SEGURA M, XU JG. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2007, 8(1): 29-45.
- [5] FREES D, BRØNDSTED L, INGMER H. Bacterial proteases and virulence[J]. *Sub-Cellular Biochemistry*, 2013, 66: 161-192.
- [6] KIRSTEIN J, MOLIÈRE N, DOUGAN DA, TURGAY K. Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(8): 589-599.
- [7] FREES D, SAVIJOKI K, VARMANEN P, INGMER H. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(5): 1285-1295.
- [8] KRESS W, MAGLICA Ž, WEBER-BAN E. Clp chaperone-proteases: structure and function[J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160(9): 618-628.
- [9] HOU XH, ZHANG JQ, SONG XY, MA XB, ZHANG SY. Contribution of ClpP to stress tolerance and virulence properties of *Streptococcus mutans*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(11): 1222-1232.
- [10] KWON HY, KIM SW, CHOI MH, OGUNNIYI AD, PATON JC, PARK SH, PYO SN, RHEE DK. Effect of heat shock and mutations in ClpL and ClpP on virulence gene expression in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(7): 3757-3765.
- [11] VARCAMONTI M, ARSENIJEVIC S, MARTIRANI L, FUSCO D, NACLERIO G, de FELICE M. Expression of the heat shock gene clpL of *Streptococcus thermophilus* is induced by both heat and cold shock[J]. *Microbial Cell Factories*, 2006, 5: 6.
- [12] KWON HY, OGUNNIYI AD, CHOI MH, PYO SN, RHEE DK, PATON JC. The ClpP protease of *Streptococcus pneumoniae* modulates virulence gene expression and protects against fatal pneumococcal challenge[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(10): 5646-5653.
- [13] ROBERTSON GT, NG WL, FOLEY J, GILMOUR R, WINKLER ME. Global transcriptional analysis of clpP mutations of type 2 *Streptococcus pneumoniae* and their effects on physiology and virulence[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(13): 3508-3520.
- [14] IBRAHIM YM, KERR AR, SILVA NA, MITCHELL TJ. Contribution of the ATP-dependent protease ClpCP to the autolysis and virulence of *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(2): 730-740.
- [15] KAJFASZ JK, MARTINEZ AR, RIVERA-RAMOS I, ABRANCHES J, KOO H, QUIVEY RG Jr, LEMOS JA. Role of Clp proteins in expression of virulence properties of *Streptococcus mutans*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(7): 2060-2068.
- [16] ZHU HD, NI YX, ZHOU JM, YU ZY, MAO AH, WANG DD, HE KW. Complete genome sequence of *Streptococcus suis* serotype 2 virulent strain SS2-1[J]. *Genome Announcements*, 2018, 6(10): e00067-18.
- [17] ROY S, ZHU YC, MA JL, ROY AC, ZHANG Y, ZHONG XJ, PAN ZH, YAO HC. Role of ClpX and ClpP in *Streptococcus suis* serotype 2 stress tolerance and virulence[J]. *Microbiological Research*, 2019, 223: 99-109.
- [18] 王继春, 何孔旺, 何家惠, 倪艳秀, 侯继波, 吕立新, 刘冬霞. 猪链球菌 2 型动物致病性试验研究[J]. *中国兽医科技*, 2001, 31(8): 27-29.
- [19] WANG JC, HE KW, HE JH, NI YX, HOU JB, (LÜ/LV/LU/LYU) LX, LIU DX. Experimental study on pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 in animals[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2001, 31(8): 27-29 (in Chinese).
- [19] TAKAMATSU D, OSAKI M, SEKIZAKI T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*[J]. *Plasmid*, 2001, 46(2): 140-148.
- [20] JU CX, GU HW, LU CP. Characterization and functional analysis of atl, a novel gene encoding autolysin in *Streptococcus suis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(6): 1464-1473.
- [21] ZHU HD, ZHOU JM, NI YX, YU ZY, MAO AH, HU YY, WANG W, ZHANG XH, WEN LB, LI B, WANG XM, YU Y, LV LX, GUO RL, LU CP, HE KW. Contribution of eukaryotic-type serine/threonine kinase to stress response and virulence of *Streptococcus suis*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91971.
- [22] LI Q, ZHANG YH, DU DC, YU YF, ZHANG W. Characterization and functional analysis of PnuC that is

- involved in the oxidative stress tolerance and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 216: 198-206.
- [23] BONIFAIT L, deLa CRUZ DOMINGUEZ-PUNARO M, VAILLANCOURT K, BART C, SLATER J, FRENETTE M, GOTTSCHALK M, GRENIER D. The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for *Streptococcus suis*[J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 42.
- [24] TANG YL, ZHANG XY, WU W, LU ZY, FANG WH. Inactivation of the *sodA* gene of *Streptococcus suis* type 2 encoding superoxide dismutase leads to reduced virulence to mice[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 158(3/4): 360-366.
- [25] FITTIPALDI N, SEGURA M, GRENIER D, GOTTSCHALK M. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*[J]. *Future Microbiology*, 2012, 7(2): 259-279.
- [26] HOURY WA. Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2001, 2(3): 227-244.
- [27] ILLIGMANN A, THOMA Y, PAN S, REINHARDT L, BRÖTZ-OESTERHELT H. Contribution of the *clp* protease to bacterial survival and mitochondrial homeostasis[J]. *Microbial Physiology*, 2021, 31(3): 260-279.
- [28] PARK SS, KWON HY, TRAN TDH, CHOI MH, JUNG SH, LEE S, BRILES DE, RHEE DK. ClpL is a chaperone without auxiliary factors[J]. *The FEBS Journal*, 2015, 282(8): 1352-1367.
- [29] TAO L, BISWAS I. ClpL is required for folding of CtsR in *Streptococcus mutans*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(3): 576-584.
- [30] TRAN TDH, KWON HY, KIM EH, KIM KW, BRILES DE, PYO S, RHEE DK. Heat-shock protein ClpL/HSP100 increases penicillin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*, 2011, 72: 126-128.
- [31] SUOKKO A, POUTANEN M, SAVIJOKI K, KALKKINEN N, VARMANEN P. ClpL is essential for induction of thermotolerance and is potentially part of the HrcA regulon in *Lactobacillus gasseri*[J]. *Proteomics*, 2008, 8(5): 1029-1041.
- [32] YANG L, WU ZH, MA TY, ZENG H, CHEN M, ZHANG YA, ZHOU Y. Identification of ClpB, a molecular chaperone involved in the stress tolerance and virulence of *Streptococcus agalactiae*[J]. *Veterinary Research*, 2024, 55(1): 60.
- [33] FREES D, CHASTANET A, QAZI S, SØRENSEN K, HILL P, MSADEK T, INGMER H. Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 54(5): 1445-1462.
- [34] PÖNTINEN A, AALTO-ARANEDA M, LINDSTRÖM M, KORKEALA H. Heat Resistance Mediated by pLM58 Plasmid-Borne ClpL in *Listeria monocytogenes*[J]. *mSphere*, 2017, 2(6): e00364-17.
- [35] REINOSO-VIZCAINO NM, CIAN MB, CORTES PR, OLIVERO NB, HERNANDEZ-MORFA M, PIÑAS GE, BADAPANDA C, RATHORE A, PEREZ DR, ECHENIQUE J. The pneumococcal two-component system SirRH is linked to enhanced intracellular survival of *Streptococcus pneumoniae* in influenza-infected pulmonary cells[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(8): e1008761.
- [36] CHARPENTIER E, NOVAK R, TUOMANEN E. Regulation of growth inhibition at high temperature, autolysis, transformation and adherence in *Streptococcus pneumoniae* by *clpC*[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 37(4): 717-726.
- [37] NAIR S, FREHEL C, NGUYEN L, ESCUYER V, BERCHE P. ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 31(1): 185-196.