

## 2 型猪链球菌中国强毒株 05ZYH33 *sao* 基因 敲除突变株的构建及其生物学功能

刘文静<sup>1,2</sup> 潘秀珍<sup>1,2\*</sup> 李先富<sup>2</sup> 王长军<sup>2</sup> 唐家琪<sup>2</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院 江苏 南京 210046)

(2. 南京军区军事医学研究所 江苏 南京 210002)

**摘要:** 构建 2 型猪链球菌(*Streptococcus suis* serotype 2, *S. suis* 2)中国强毒株 05ZYH33 的 *sao* 基因敲除突变株。构建中间为壮观霉素抗性基因, 两侧为 *sao* 编码基因上下游同源序列的基因敲除载体, 同源重组筛选 *sao* 基因敲除突变株。PCR、RT-PCR、Western Blot 对疑似突变株进行验证, 实验结果均证实 *sao* 基因完全被 *spc* 抗性基因替代, 成功构建了突变株 05ZYH33 $\Delta$ *sao*。对野生型菌株和突变株进行菌落溶血活性、生长特性、小鼠致病性比较, 结果表明 *sao* 基因的敲除并未使野生型菌株在以上三方面产生明显的变化。筛选获得的 05ZYH33 *sao* 基因突变株为进一步研究 *sao* 基因在 05ZYH33 致病过程中的作用奠定了基础。

**关键词:** 2 型猪链球菌, *sao* 基因, 敲除突变体, 生物特性

## Construction and Characterization of *sao* Gene Knock-out Mutant of *Streptococcus suis* Serotype 2 Chinese Highly Virulent Strain 05ZYH33

LIU Wen-Jing<sup>1,2</sup> PAN Xiu-Zhen<sup>1,2\*</sup> LI Xian-Fu<sup>2</sup> WANG Chang-Jun<sup>2</sup> TANG Jia-Qi<sup>2</sup>

(1. Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210046, China)

(2. Institute of Military Medical Sciences, Nanjing Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

**Abstract:** To construct the mutant strain  $\Delta$ *sao*, the recombinant gene knock-out vector was constructed consisting of *Spc<sup>r</sup>* cassette with the flanking homology regions of gene *sao*. The *sao* gene was replaced by *Spc<sup>r</sup>* cassette according to the principle of homologous recombination. PCR analysis, RT-PCR analysis and western blot were used to confirm that *sao* gene was replaced completely by the *Spc<sup>r</sup>* cassette. The results suggested that the mutant of 05ZYH33 *sao* gene was successfully constructed. Analysis of biological characteristics showed that there were no obvious distinctions in hemolytic activity, growth characteristics and virulence between the mutant and the wild type strain 05ZYH33. The construction of the mutant strain 05ZYH33 $\Delta$ *sao* laid the foundation for further research on the role of *sao* during infection.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30730081, 81071317, 30972638); 江苏省自然科学基金项目(No. BK2010113, BK2010114, BK2010025, BK2009042); 南京军区医学科技创新课题(No. 07Z045, 09Z040); 南京军区卫生专业人才培养“122”工程资助项目

\* 通讯作者: Tel: 86-25-84507094; 信箱: panxiuzhen\_2004@163.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

收稿日期: 2010-06-29; 接受日期: 2010-09-30

**Keywords:** *Streptococcus suis* serotype 2, *sao* gene, Knock-out mutant, Biological characteristics

作为一种重要的人兽共患病病原体, *S. suis* 2 不仅可以引起猪患败血症、脑膜炎、心内膜炎、关节炎、肺炎和猝死症, 而且也会导致从业人员感染患中毒性休克综合症、脑膜炎及败血症等严重疾病<sup>[1-2]</sup>, 但其具体的致病机制尚不明确。现在普遍认为关于细菌表面蛋白的研究对于了解病原菌的致病机制具有十分重要的意义<sup>[3-4]</sup>。Surface antigen one (Sao) 是一种新发现的表面抗原, 广泛分布于 *S. suis* 不同分离株中, 且具有序列保守性<sup>[5-6]</sup>。对猪链球菌的研究发现, Sao 蛋白具有 3 种变异类型: Sao-L、Sao-M 和 Sao-S, 其中 Sao-M 最常见; 利用 Sao-M 蛋白免疫猪可观察到明显的体液免疫反应; 建立在 Sao-M 基础

上的 ELISA 检测方法可以成功的监测猪链球菌的感染, 但是对 Sao 蛋白在 2 型猪链球菌致病过程中的作用仍不清楚<sup>[5-7]</sup>。本研究以中国强毒株 05ZYH33 为对象, 采用同源重组的方法成功构建了 *sao* 基因突变株, 并对其生物特性进行了初步研究, 为进一步研究 Sao 蛋白在 2 型猪链球菌致病过程中的作用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和引物

实验所用的菌株、质粒和引物见表 1, 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。

表 1 实验所用的菌株、质粒和引物  
Table 1 Bacterial strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒及引物 Strain, plasmid, primer	表型及相关特征 Phenotype, related characteristic	来源 Origin
菌株 Strains		
05ZYH33	血清型 2 型, 强致病株	本室保存
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>deoR</i> , <i>recA</i> , <i>endA</i> , <i>hsdR</i> , <i>supE</i> , <i>thi</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA</i>	本室保存
质粒 Plasmids		
pEASY-simple-T1	T 载体, <i>LacZ</i> , <i>Amp</i> <sup>r</sup>	Beijing TransGen
pEASY-T1	T 载体, <i>LacZ</i> , <i>Amp</i> <sup>r</sup>	Beijing TransGen
pSET2	<i>E. coli</i> - <i>S. suis</i> 穿梭质粒, <i>Spc</i> <sup>r</sup>	TaKamatsu et al.
pEASY-T1- <i>sao</i>	<i>sao</i> 基因敲除载体, <i>Amp</i> <sup>r</sup> , <i>Spc</i> <sup>r</sup>	本文构建
引物 Primers		
LA1	ACTA <u>AAGCTT</u> CAGAACAACAATCCCT	(下划线为 <i>Hind</i> III 酶切位点)
LA2	TGCGAGCTC <u>ATTTT</u> TACATCTAAAGT	(下划线为 <i>Sac</i> I 酶切位点)
RA1	GCGCTCGAGTAATAATCACCTAACTGA	(下划线为 <i>Xho</i> I 酶切位点)
RA2	<u>GGGCCCA</u> AGAACAACAAGAAATT	(下划线为 <i>Apa</i> I 酶切位点)
Spc1	<u>GAGCTCGTTC</u> GTGAATACATGTTA	(下划线为 <i>Sac</i> I 酶切位点)
Spc2	<u>CTCGAGGTTT</u> TCTAAAATCTGATT	(下划线为 <i>Xho</i> I 酶切位点)
Checkin1	TACAGCTCAAAAATACAAAAGAGGGT	
Checkin2	ATTGTCCTTCTCATTAAACAGGCATC	
Out1	CTGGAATATCTCTTAGAACAACATGC	
Out2	GCTCACGTACACCGATTGTTTTA	

### 1.2 主要试剂和仪器

ExTaq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒 DNA 抽提试剂盒、PrimeScript<sup>TM</sup> 1st Strand cDNA Synthesis Kit 均为 TaKaRa 公司产品, 胶回收试剂盒、SV Total RNA Isolation System 为 Promega 公司产品, Todd-Hewitt Broth (THB) 培养基为 Difco 公司产品。蛋白裂解抽提试剂盒为上

海捷瑞生物公司产品。Gene Pulser Xcell 型电穿孔仪为 Bio-Rad 公司产品, Ultraspec 2000 型紫外分光光度计为 Pharmacia 公司产品。

### 1.3 *S. suis* 2 05ZYH33 *sao* 基因敲除突变株的构建和鉴定

**1.3.1 基因敲除载体的构建:** 以 *S. suis* 2 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 用引物对 LA1/2、RA1/2 进行

PCR, 分别扩增 *sao* 基因的上游 DNA 片段 LA 及下游 DNA 片段 RA, 同时以 pSET2 质粒为模版, 用引物 Spc1/2 扩增壮观霉素抗性基因(*Spc<sup>r</sup>* cassette)。分别将 LA、RA 片段连接到 pEASY-Simple-T1 上, *spc* 片段连接到 pEASY-T1 上。在限制性内切酶 *Hind* III 和 *Sac* I 及 T4 DNA 连接酶的作用下, 将 LA 连接到 pEASY-T1-*spc* 上, 再利用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Apa* I 及 T4 DNA 连接酶将 RA 连接到 pEASY-T1-LA-*spc* 上, 形成一个 *Spc<sup>r</sup>* 基因两侧具有与 *sao* 上下游同源序列同源的基因敲除载体 pEASY-T1-*sao*(图 1)。

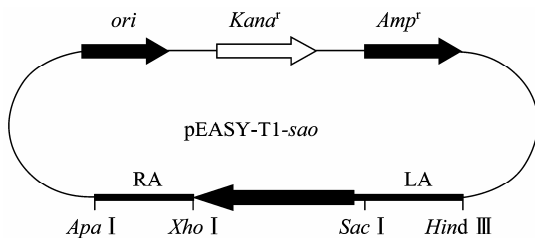


图 1 *sao* 基因敲除载体构建示意图

Fig. 1 Construction of plasmid pEASY-T1-*sao*

**1.3.2 基因敲除突变株的初步筛选:** 参照 Smith 等<sup>[8]</sup>的方法制备 *S. suis* 2 05ZYH33 感受态细菌。在 22.5 Kv/cm、500  $\Omega$  和 25  $\mu$ F 电转参数下, 用构建好的基因敲除载体电转化感受态细菌, 电转结束后将菌液涂布于 THB 平板(含 100 g/mL 壮观霉素), 37°C 培养 48 h 后, 挑取所有的单菌落进行增菌培养并取 2  $\mu$ L 菌液作模板, 用引物 Checkin 1/2 (位于 *sao* 基因的内部)进行 PCR 初步筛选。

**1.3.3 突变菌株的交叉 PCR 验证:** 分别于编码基因上、下游片段 LA 和 RA 的两侧再设计 1 对引物 Out1/2, 引物的位置如图 2 所示。分别用引物 Checkin1/2、Spc1/2、Spc1/Out2 和 Out1/Spc2 对野生型菌株和突变株进行交叉 PCR 扩增。

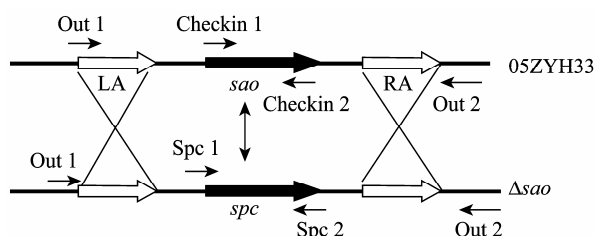


图 2 同源重组图示

Fig. 2 Homologous recombination

**1.3.4 突变株的 RT-PCR 验证:** 取 1 mL  $OD_{600}$  值为 0.6 的野生型菌株 05ZYH33 和突变株  $\Delta$ *sao*, 依据 SV Total RNA Isolation System 说明书上的方法分别提取二者的总 RNA。利用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 将提取的 RNA 反转录成 cDNA。并通过混合引物<sup>[9]</sup>和引物对 Checkin1/2 对 RNA、cDNA 进行鉴定。

**1.3.5 Western Blot 分析:** 利用蛋白裂解抽提试剂获得野生型菌株 05ZYH33 和突变株  $\Delta$ *sao* 的全菌蛋白。采用电转印法将 12% SDS-PAGE 电泳后胶上的全菌蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 40 min, 加鼠抗 Sao 蛋白抗血清(1:10000), 4°C 孵育过夜, 再加山羊抗鼠 HRP-IgG (1:5000), 37°C 孵育 1 h, 加底物邻苯二胺(DAB)显色。

**1.3.6 菌落溶血活性的比较:** 将野生菌株 05ZYH33 和突变菌株  $\Delta$ *sao* 用三线法分别划线接种于 THB 琼脂血平板上(5% 的绵羊血), 37°C 培养, 观察二者在菌落形态和溶血活性方面有无差别。

**1.3.7 菌株生长特性的比较:** 为评估基因 *sao* 的缺失对 05ZYH33 生长的影响, 用 2 种办法进行测试。

(1) 生长曲线的比较: 分别接种相当数量的对数生长期突变株和野生型菌株于 5 mL THB 培养基中, 每隔 1 h 分别取样测  $OD_{600}$  值, 以培养时间为横坐标,  $OD_{600}$  为纵坐标, 绘制二者的生长曲线, 比较有无显著差别(3 次重复)。(2) 称量菌体湿重: 用 50 mL THY 液体培养基于 37°C、160 r/min 培养菌株 16 h, 测其  $OD_{600}$ , 同时离心收集菌体, 并用电子天平称量其湿重(3 次重复)。

**1.3.8 小鼠致病性实验:** 参照 Beaudoin 等<sup>[10]</sup>的方法进行。取 BALB/c 小鼠共 30 只, 随机分为 3 组, 每组 10 只。将野生型菌株 05ZYH33 和突变株  $\Delta$ *sao* 于 37°C 过夜培养, 次日以 1:100 的比例接种于新鲜 THB 中生长至  $OD_{600} = 1.0$ , 菌液用 THB 稀释 5 倍后, 取 1 mL (约  $10^8$  CFU) 菌液腹腔注射小鼠。阴性对照组注射 THB 培养基 1 mL。

## 2 结果

### 2.1 *S. suis* 2 05ZYH33 *sao* 基因敲除突变株的初步筛选

用引物对 Checkin1/2 对挑取的单菌落菌液进行 PCR。由于 Checkin1/2 位于 *sao* 基因内部(产物大小为 1195 bp), 如果基因 *sao* 被敲除, 用引物

Checkin1/2 进行扩增会得到阴性结果,反之则说明 *sao* 未被敲掉。通过这种方法进行初步筛选。在一组菌液 PCR 扩增中, Checkin1/2 引物扩增结果(图 3)中第 10 泳道为阴性,选择该株做进一步验证。

## 2.2 *S. suis* 2 05ZYH33 *sao* 基因敲除突变株的交叉 PCR 鉴定

如果发生双向同源重组, *spc* 基因将取代 *sao* 基因,用引物的 Out1/Spc2、Spc1/Out2 和 Spc1/2 进行 PCR 就应该扩出大小分别为 2181、2147 和 1130 bp 的片段,而在野生菌株 05ZYH33 中,用以上引物进行 PCR 都会得到阴性结果。原来以 05ZYH33 基因

组为模板,用引物 Checkin1/2 能扩出的 1195 bp 片段在突变株中不会存在。交叉 PCR 鉴定结果(图 4)与以上理论完全一致。

## 2.3 *S. suis* 2 05ZYH33 *sao* 基因敲除突变株的反转录 PCR 鉴定

混合引物分别对 05ZYH33 和突变株  $\Delta$ *sao* 总 RNA 和 cDNA 进行扩增,结果表明获得了高纯度的 RNA,并且成功转录出 cDNA; Checkin1/2 引物分别对二者反转录得到的 cDNA 进行扩增,在野生型菌株 05ZYH33 中结果为阳性,说明 *sao* 正常转录,而在突变株  $\Delta$ *sao* 中为阴性, *sao* 不能正常转录(图 5)。

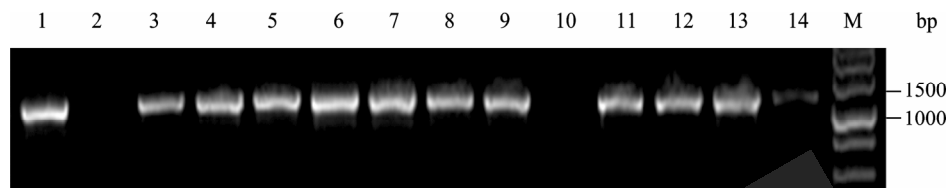


图 3 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR analysis

注: 1: 阳性对照(05ZYH33 基因组 DNA 模板); 2: 阴性对照(无菌水为模板); 3-14: 突变株 3-14.

Note: 1: Positive control (DNA of 05ZYH33); 2: Negative control (Sterile water); 3-14: Mutant strains.



图 4 交叉 PCR 鉴定

Fig. 4 Cross-PCR analysis

Note: Out1/Spc2: 1:  $\Delta$ *sao*; 2: 05ZYH33. Spc1/Out2; 3:  $\Delta$ *sao*; 4: 05ZYH33. Spc1/2; 5:  $\Delta$ *sao*; 6: 05ZYH33. Checkin1/2; 7:  $\Delta$ *sao*; 8: 05ZYH33.

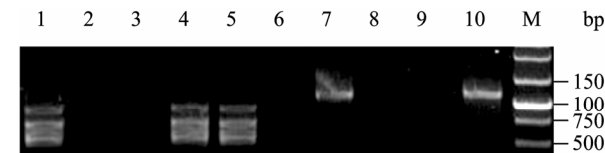


图 5 反转录 PCR 鉴定

Fig. 5 RT-PCR analysis

注: 混合引物: 1: 阳性对照(05ZYH33 基因组 DNA 模板); 2: 阴性对照(无菌水为模板); 3: 05ZYH33 的 RNA; 4: 05ZYH33 的 cDNA; 5:  $\Delta$ *sao* 的 cDNA; 6:  $\Delta$ *sao* 的 RNA. Checkin1/2 引物对: 7: 05ZYH33 的 cDNA; 8:  $\Delta$ *sao* 的 cDNA; 9: 阴性对照(无菌水为模板); 10: 阳性对照(05ZYH33 基因组 DNA 模板).

Note: Mixture of primers: 1: Positive control (DNA of 05ZYH33); 2: Negative control (sterile water); 3: RNA of 05ZYH33; 4: cDNA of 05ZYH33; 5: cDNA of  $\Delta$ *sao*; 6: RNA of  $\Delta$ *sao*. checkin1/2: 7: cDNA of 05ZYH33; 8: cDNA of  $\Delta$ *sao*; 9: Negative control (sterile water); 10: Positive control (DNA of 05ZYH33).

## 2.4 *S. suis* 2 05ZYH33 *sao* 基因敲除突变株的 Western Blot 鉴定

特异性 Sao 蛋白鼠多抗可以和细菌表面蛋白 Sao 结合。如果基因 *sao* 被敲除后,细菌不能表达 Sao 蛋白, Western Blot 会得到阴性结果,而野生型菌株中该基因正常表达,会出现阳性结果。Western Blot 的结果(图 6)与理论一致,在蛋白水平上证明了基因 *sao* 确实已被取代。

## 2.5 菌落溶血活性比较

采用三线法将野生型菌株 05ZYH33 和突变株  $\Delta$ *sao* 接种于 THB 血平板(含 5%绵羊血)上, 37°C 培养

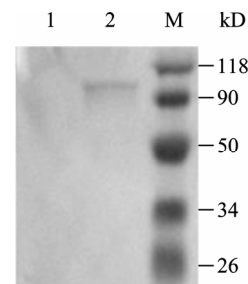


图 6 Western Blot 鉴定

Fig. 6 Western Blot analysis

注: 1:  $\Delta$ *sao*; 2: 05ZYH33.

Note: 1:  $\Delta$ *sao*; 2: 05ZYH33.

24 h 后, 可见二者均长出灰白色、圆形半透明、表面湿润光滑的细小菌落, 直径均在 1 mm–2 mm。菌落周围均有明显的  $\beta$ -溶血环, 宽度为 1 mm–2 mm。表明 *sao* 基因敲除后菌体的菌落形态和溶血活性未发生明显变化。

## 2.6 细菌生长特性比较

05ZYH33 和突变株  $\Delta s ao$  生长特性的比较结果表明二者的生长速率相近(图 7A), 同时湿重比较结果亦显示基因 *sao* 缺失对 05ZYH33 生物量的积累同样没有显著影响(图 7B)。

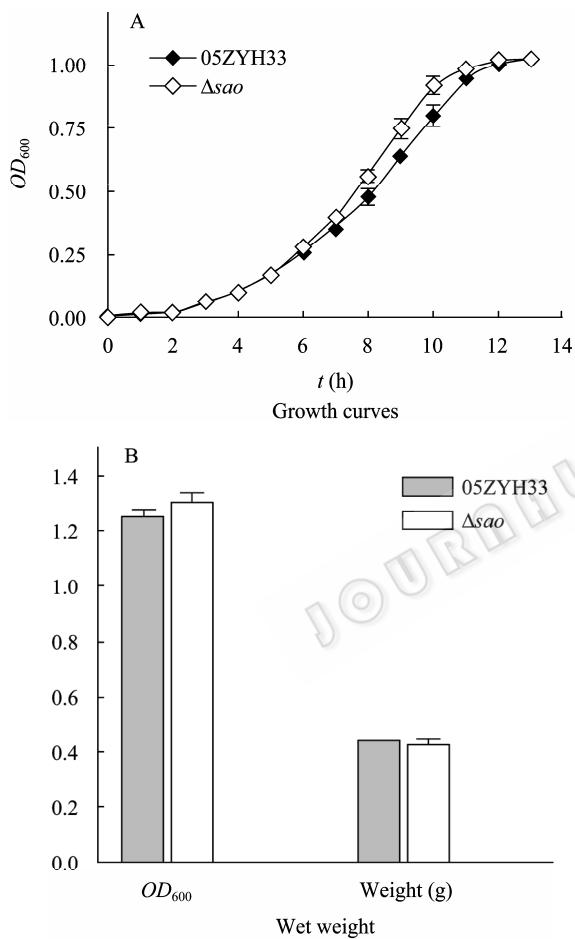


图 7 生长特性比较

Fig. 7 Growth characteristics analysis

注: A: 生长曲线; B: 湿重法。

Note: A: Growth curves; B: Wet weight.

## 2.7 小鼠致病性实验

观察结果显示, 攻毒 4 h 后小鼠开始出现发病症状。12 h 后野生型菌株注射组 10 只全部死亡, 突变株死亡 8 只, 另外 2 只精神状态较好。阴性对照组 10 只状态均良好。持续观察 3 d, 未见发病和异常情况发生。用 Kaplan-Meier 生存函数分析方法比

较突变株与野生组小鼠的存活率, 并绘制生存曲线(图 8)。  $P > 0.05$ , 说明 *sao* 基因敲除并没有对 05ZYH33 的毒力产生影响。

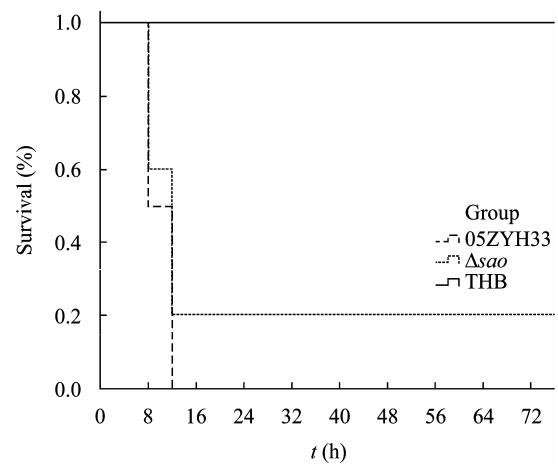


图 8 小鼠生存曲线

Fig. 8 Survival curves for BABL/c mice infectional experiments

## 3 讨论

Surface Antigen One (Sao)蛋白是 Yuanyi Li 等在对 *S. suis* 致病机制和疫苗开发研究过程中, 从 *S. suis* 2 分离菌株 S735 中获得的一种表面蛋白<sup>[6]</sup>。通过在 GenBank 数据库中进行 BLASTp 搜索, 发现 Sao 蛋白的重复区域序列与一种植物病原菌即水稻黄单胞菌的无毒结构域 AvrXa7 具有相似性<sup>[6]</sup>。在植物病原菌中 *avr* 基因的编码产物可以通过 III 型分泌系统以配体的形式结合到植物宿主细胞的 R 蛋白上, 激活植物防御系统, 但往往会导致过敏反应。动物病原菌即假结核耶尔森菌的 YopJ 蛋白与植物病原菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 的无毒蛋白 AvrRxv 具有序列的相似性。YopJ 可通过 III 型分泌系统到达宿主细胞, 诱导巨噬细胞系 RAW264.7 的凋亡<sup>[11]</sup>。 *Yersinia enterocolitica* 的 YopP 也与植物病原菌 *Xanthomonas campestris* 的无毒蛋白 AvrRxv 具有高度的序列相似性。YopP 蛋白在 *Yersinia enterocolitica* 诱导巨噬细胞系 J774A.1 凋亡的过程中起到重要作用<sup>[12]</sup>。Feng 等研究发现 Sao 蛋白存在 3 种变异类型: Sao-L、Sao-M 和 Sao-S, 中国强毒株 05ZYH33 中是以 Sao-M 的形式存在, 其 C 末端重复区域含有 7 个重复单元, 而 Sao-L 含有 10 个重复单元<sup>[5]</sup>。因此深入研究并阐明 Sao-M 含有的重复区域

和 Sao 本身的生物学功能以及其在 *S. suis* 2 与宿主细胞的相互作用过程中是否发挥一定的作用显得十分必要。

本实验利用同源重组技术, 通过构建一个 *Sp<sup>c</sup>* 基因两侧具有与 *sao* 上下游同源序列同源的基因敲除载体 pEASY-T1-*sao*, 以 *spc* 基因替代 *sao* 基因, 成功获得了 *sao* 基因敲除突变菌株, 并通过 PCR、RT-PCR、Western Blot 对敲除突变株在基因、转录和蛋白水平上进行了鉴定, 结果证实敲除株构建成功。生物学特性比较显示, *sao* 基因突变株和野生型菌株在溶血活性、生长特性方面没有明显差异。猪链球菌感染 BABL/c 小鼠模型结果表明 *sao* 基因的缺失并未影响 *S. suis* 2 05ZYH33 的毒力, 可能原因有以下两方面: 一方面是 *S. suis* 2 05ZYH33 的强致病性是多种毒力因子相互作用的结果; 另一方面, 通过 BLAST 分析, 格氏链球菌中其同源蛋白的 LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly; X 代表任一种氨基酸) 基序与细胞外基质胶原蛋白的结合有关<sup>[13]</sup>, 所以我们推测 Sao 蛋白可能与细菌的粘附有关, 并不是该菌强致病性的重要因素。鉴于 *S. suis* 2 的天然宿主是猪仔, 本实验还需要通过猪仔模型对 *sao* 基因做进一步的研究, 以期阐明 *sao* 基因在 *S. suis* 2 致病过程中的具体作用, 为猪链球菌致病机理的研究和防治提供参考。

## 参 考 文 献

- [1] Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, *et al.* *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun*, 1997, **21**(6): 381-407.
- [2] Lun ZR, Wang QP, Chen XG, *et al.* *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis*, 2007, **7**(3): 201-209.
- [3] Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, **63**(1): 174-229.
- [4] Cabanes D, Dehoux P, Dussurget O, *et al.* Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol*, 2002, **10**(5): 238-245.
- [5] Feng YJ, Zheng F, Pan XZ, *et al.* Existence and characterization of allelic variants of Sao, a newly identified surface protein from *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiology Letters*, 2007(275): 80-88.
- [6] Li Y, Martinez G, Gottschalk M, *et al.* Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infect Immun*, 2006, **74**(1): 305-312.
- [7] Li Y, Gottschalk M, Esgleas M, *et al.* Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, **14**(8): 937-943.
- [8] Smith HE, Wisselink HJ, Vecht U, *et al.* High efficiency transformation and gene inactivation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2. *Microbiology*, 1995, **141**(Pt 1): 181-188.
- [9] 王花茄, 王长军, 陆承平, 等. 致病性猪链球菌主要毒力因子基因多重 PCR 检测. *中华流行病学杂志*, 2005, **26**(9): 640-644.
- [10] Beaudoin M, Higgins R, Harel J, *et al.* Studies on a nar-rine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, **78**(2/3): 111-116.
- [11] Denise MM, Joan M, Nafisa G, *et al.* *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997(94): 10385-10390.
- [12] Scitt DM, Anne Boland, Marie PS, *et al.* *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1997(94): 12638-12643.
- [13] Manuel JR-O, Inmaculada L, Carmen T. Overcoming function annotation errors in the Gram-positive pathogen *Streptococcus suis* by a proteomics-driven approach. *BMC Genomics*, 2008, **9**(1): 588-599.