

猪链球菌 2 型可能的毒力基因的发现

田 云¹ Frank M Aarestrup² 陆承平^{1*}

(¹南京农业大学动物医学院 南京 210095)

(²丹麦国家食品及兽医研究所 哥本哈根 DK-1790 Copenhagen V)

摘 要 猪链球菌 2 型 (SS2) 感染已成为影响全世界养猪业的重要问题之一。SS2 菌株可分为毒力株、弱毒力株和无毒力株,但目前尚无区分此 3 类菌株的快速、有效的检测方法。为了获得毒力株特异的基因序列,对毒力株 HA9801 及无毒力株 12[#] 进行了抑制性差减杂交 (SSH) 实验,获得了 5 个可能的新的毒力基因片段,分别是转录调节子、氨基酸通透酶、ABC 转运子及表面锚定蛋白,在国内外尚属首次报道。这一发现将有助于区分 SS2 型菌株的毒力类型,并为 SS2 毒力株检测方法的建立奠定基础。

关键词 猪链球菌 2 型,抑制性差减杂交 (SSH),可能的毒力基因

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2004) 05-0613-04

猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 根据其荚膜抗原的不同,已有 35 种血清型被发现。其中,猪链球菌 2 型 (SS2) 是全世界被最频繁分离到的血清型^[1,2]。

在 SS2 内,存在着有毒力的、弱毒的和非致病性的菌株^[3,4]。有毒力的菌株可以引起猪的严重的临床症状 (如脑膜炎),在人工感染后,可从猪的中枢神经系统和关节部位分离到大量的细菌。而弱毒力的菌株只能引起轻微的临床症状 (如肺炎),在人工感染后,只能偶尔从感染猪的中枢神经系统和关节部位分离到细菌^[3,4]。非致病性的菌株在人工感染仔猪后,对猪是完全无毒力的^[3,4]。SS2 菌株可以定殖健康猪和非健康猪的扁桃体^[5]。亚临床的携带动物是将猪链球菌传播给敏感动物的主要来源^[6]。在猪群中,携带率可以从 0% 到 100%^[5-7]。但是,在携带率与发病水平之间没有任何关联^[5,7]。对携带状态的了解可使人们对猪链球菌感染的流行病学有更好的了解,并且将有助于提出有效的控制措施。

目前,尚无检测猪体 SS2 携带毒力菌的敏感、特异性的方法。尽管如溶菌酶释放蛋白 (Murinidase-released, MRP)、胞外因子 (Extracellular factor, EF) 和溶血素 (Haemolysin) 等毒力因子已经被发现^[8-10],但是在毒力株、弱毒力株和非致病性菌株之间的毒力差异仍不能用这些因子加以解释,因此推测有其它因子导致了其毒力差异。本实验采用抑制性差减杂交 (SSH) 方法,对毒力菌株与无毒力菌株之间的遗

传差异进行了研究,以期发现新的毒力因子。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

SS2 菌株 HA9801 和 12[#] 分别作为有毒力菌株和无毒力菌株的代表株。SS2 菌株 HA9801 株于 1998 年分离于江苏的病猪,其症状为脑膜炎^[11]。12[#] 菌株则是由荷兰 DLO 动物科学及卫生所的 Vecht 等^[3,4,2] 从正常动物的扁桃体中分离,经动物实验表明是无毒力的菌株。所有 SS2 菌株均用 Todd-Heitt 肉汤或牛血平板培养。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ElectroTen-Blue 被用做克隆细菌,并且有氧培养于 LB 培养基内。当被用于培养携带有质粒的细菌时, Luria 肉汤及琼脂添加氨苄青霉素的浓度为 100 μg/mL。pCR2.1 被用做克隆及测序载体 (表 1)。

表 1 实验用菌株及载体

| Strains or plasmid | Properties | Source |
|---------------------------|--|-------------|
| <i>S. suis</i> serotype 2 | | |
| HA9801 | Wild-type, virulent | China |
| 12 | Wild-type, avirulent | Netherlands |
| <i>E. coli</i> | | |
| ElectroTen-Blue | Amp ^r Kan ^r | Stratagene |
| Plasmid | | |
| pCR2.1 | Amp ^r Kan ^r lacZ | Invitrogen |

基金项目: 国家 973 项目 (G1999011906) 高教博士点基金 (20002307034)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-84396517 E-mail: luep@njau.edu.cn

作者简介: 田 云 (1976-) 女, 黑龙江巴彦人, 博士, 研究方向为兽医微生物学与免疫学。E-mail: tytian@yahoo.com.cn

收稿日期: 2003-12-29, 修回日期: 2004-04-16

1.2 试剂

基因组提取试剂盒购自 Promega 公司;基因组差减试剂盒购自 Clontech 公司;DIG 探针标记试剂盒购自 Roche 公司;质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司;核酸测序试剂盒购自 Perkin-Elmer 公司。

1.3 DNA 的提取

按照试剂盒中的使用说明对细菌的基因组及质粒进行提取。

1.4 抑制性差减杂交 (SSH)

按照 PCR-Select Bacterial Genome Subtraction Kit (Clontech) 的手册进行。简言之,就是将 tester (HA9801) 及 driver (12[#]) 的基因组 DNA 用 *Rsa* I 酶消化后, tester DNA 被分成两部分,分别与两种不同的 Adaptor 连接后,开始差减杂交。两次杂交均使用 63℃。在第一次杂交中,过量的 driver DNA 被分别加入到每种 Adaptor 连接后的 tester 样品中,样品被热变性后即开始退火。在第二次杂交中,将以上两个杂交样品与新鲜变性的 drive DNA 混合后,63℃ 杂交过夜。杂交后终产物经两次 PCR 扩增 PCR (1) 及 PCR (2) 后所得基因即为 HA9801 株特异性的序列。将 PCR 产物与 pCR2.1 T 载体连接后,转化于 *E. coli* ElectroTen-Blue 感受态细胞中。阳性克隆于含有 X-Gal、IPTG 及氨苄青霉素的 LB 平板上进行筛选。

1.5 差异筛选

Dot blot 方法被用于鉴定那些 HA9801 株特异性的差减克隆。随机引物标记的 HA9801 及 12[#] 细菌基因组 DNA 被用做探针,与差减克隆的 PCR 产物进行杂交筛选。

1.6 测序

使用 Applied Biosystems PRISM 377 自动测序仪完成了对阳性克隆的测序工作。使用 Vector NTI8.0 进行了序列的组装及同源性查找。

2 结果

2.1 抑制性差减杂交

SS2 HA9801 及 *E. coli* 对照的杂交后样品分别被称为 1-1 及 2-1,而同时与两种 Adaptor 连接的未杂交的对照,则分别被称为 1-c 及 2-c。SSH 中虽然采用了抑制性 PCR,但是仍然难以避免非特异性的扩增,故 SSH 试剂盒中包括了两次 PCR 过程(套式 PCR)。

泳道 1 及 2 分别是 1-1 及 1-c 的 28 个循环后的结果(PCR 1),而泳道 3 及 4 分别是 1-1 及 1-c 的 PCR1 产物经过 12 个循环后的结果(PCR 2)。泳道 1

~4 均为弥散性的片段,其中泳道 3 则是最终的 HA9801 株特异性的片段,其为从 500bp 到 3000bp 之间的弥散性的片段。泳道 5~8 则为对照大肠杆菌的差减结果,5 及 6 分别是 2-1 及 2-c 经 28 个循环后的结果,而 7 及 8 分别是 2-1 及 2-c 的 12 个循环的结果。对照大肠杆菌差减后的条带(5 及 7 泳道)与 ϕ x 174/*Hae* III 消化物(9 泳道)的条带相符,因差减产物连接有 Adaptor,分子量变大,故位置稍上移,表明差减良好(图 1)。

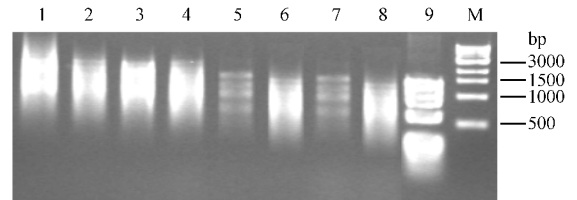


图 1 杂交后的 PCR 分析

Fig. 1 PCR analysis after hybridization

M. 1kb DNA ladder; 1. 28 cycles of 1-1; 2. 28 cycles of 1-c; 3. 12 cycles of PCR1 of 1-1; 4. 12 cycles of PCR1 of 1-c; 5. 28 cycles of 2-1; 6. 28 cycles of 2-c; 7. 12 cycles of PCR1 of 2-1; 8. 12 cycles of PCR1 of 2-c; 9. ϕ x 174/*Hae* III marker.

2.2 差异筛选

用 SSH 试剂盒中的套式引物将阳性克隆中的插入片段扩增出后,分别与 HA9801 及 12[#] 探针进行杂交。凡与 HA9801 株探针杂交,而未与 12[#] 探针杂交的样品所对应的质粒即被用于进行测序反应。杂交的结果如图 2 所示。点 5 为无插入片段的样品,即载体自连的阴性对照,其与 HA9801 及 12[#] 探针的杂交结果均为阴性,而 9[#]、10[#]、15[#]、154[#]、187[#] 及 210[#] 样品的与 HA9801 探针的杂交结果均为阳性,与 12[#] 探针的杂交结果均为阴性(图 2)。

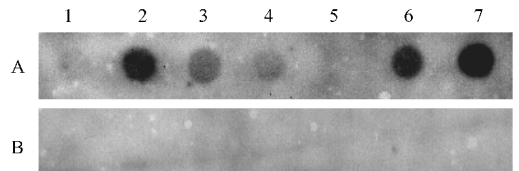


图 2 (A) 用 HA9801 探针筛选的结果 (B) 用 12[#] 探针筛选的结果

Fig. 2 (A) Screen using probe of strain HA9801 (B) Screen using probe of strain 12[#]

1~4 和 6, 7, 9[#], 10[#], 15[#], 154[#], 187[#] and 210[#] samples; 5: Negative control.

2.3 测序

转化后共获得约 500 个克隆,根据插入片段的大小,选择了 24 个阳性克隆用于测序。并将测序结果递交 GenBank 进行了同源性查找。在 24 段序列中,共发现了 6 个在 SS2 未曾报道的可能与毒力相

关的片段。其中 3 个片段 (10[#] 或 15[#] 及 154[#]) 与细菌 (*Streptococcus pneumoniae* 或 *Streptococcus mutants*) 的转录调节子具有同源性, 且发现 10[#] 片段与 15[#] 片段具有相同的序列, 1 个片段 (187[#]) 与无害李斯特氏菌 (*Listeria innocua*) 的表面锚定蛋白 [LPXTG 家

族] 具有同源性, 而 210[#] 片段则与无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 的氨基酸通透酶具有同源性, 此外 9[#] 片段与细菌 (*Methanosarcina acetivorans*) 的 ABC 转运子具有同源性 (表 2)。

表 2 测序片段的同源性查找结果

Table 2 Results of homology search of sequenced fragments

| Fragment No. | Accession No. | Homologies to predicted encoded protein | E value* | Homologue accession No. |
|--------------|---------------|--|----------|-------------------------|
| 10, 15 | AY580991 | Transcriptional regulator of <i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4 | 2e-049 | NP-346242.1 |
| 154 | AY580992 | Putative transcriptional regulator of <i>Streptococcus mutants</i> UA159 | 3e-038 | NP-721854.1 |
| 187 | AY580993 | Surface anchored protein [LPXTG motif] of <i>Listeria innocua</i> | 4e-005 | NP-469547.1 |
| 210 | AY580994 | Amino acid permease of <i>Streptococcus agalactiae</i> 2603V/R | 6e-045 | NP-688304.1 |
| 9 | AY580990 | Cobalt ABC transporter ,ATP binding protein [<i>Methanosarcina acetivorans</i> str. C2A] | 6e-056 | NP-616674.1 |

* The E value indicates the probability of the match. A match with E value of 4e-5 and below was taken to be significant (i. e. the match is not due to chance).

3 讨论

鉴定及检测微生物的毒力基因对于了解细菌的致病机制是甚为重要的。比较毒力株与弱毒力株或者无毒力株之间的基因组, 有助于鉴定毒力株仅有的可能与毒力相关的基因区域。差减杂交 (SH) 技术目前已应用于鉴定细菌^[13]及鉴定毒力岛^[14]、发现插入序列^[15]及构建检测探针^[16]等多方面, 本试验采用 SH 技术在猪链球菌 2 型 (SS2) 菌株中发现了尚未报道的 5 个可能为毒力因子的片段, 显示了 SH 技术的潜在价值及 SS2 毒力因子的复杂性。

目前认为氨基酸通透酶 (Amino acid permease) 在金黄色葡萄球菌的致病过程中起到了重要的作用。金黄色葡萄球菌可引起人的多种侵袭性感染。其脯氨酸通透酶基因 (putP) 的突变可导致其在传染性心内膜炎模型中的毒力的显著减弱^[17]。经同源性查找后发现, 210[#] 片段与氨基酸通透酶具有同源性, 故推测其可能与 SS2 菌株的毒力有关。

在感染过程中, 毒力基因短暂、适度的表达, 对于微生物病原的传染性的生命循环是至关重要的, 特别是当病原菌要适应宿主多变的环境时。目前发现 转录调节子 (Transcriptional regulator) 对于肺炎链球菌在不同模型 (如耳炎、肺炎和脑膜炎模型) 中的完整毒力是必需的^[18]。这些可能的转录调节子可以调节组织特异性毒力因子的表达。rhlA 是其中一个调节子, 它对于肺炎链球菌在鼻咽部的定殖及肺部的感染是必不可少的。本实验发现的 SS2 的转录调节子 (10 或 15 及 154 片段) 与 rhlA 调节子的功能是否有相似之处, 及它们在全身性感染的作用如

何, 仍有待于进一步的研究。此外, 与毒力相关的转录调节子也曾在铜绿假单胞菌^[19] (*Pseudomonas aeruginosa*) 及化脓链球菌^[20] (*Streptococcus pyogenes*) 中被报道。

目前普遍认为肺炎链球菌的表面锚定蛋白 (Surface anchored protein) 在黏附过程中起到了强有力作用。rrgA 编码的肺炎链球菌表面锚定蛋白, 属于 LPXTG 蛋白家族。突变实验表明, 此蛋白对于肺炎链球菌在咽部的定殖和肺的感染是必需的^[18]。经同源性查找后发现, 187[#] 片段编码的蛋白也与 LPXTG 家族蛋白具有同源性, 表明此序列可能与 SS2 的黏附过程有关。

细菌通常具有多种机制, 从环境中获得必需的微营养 (离子)。而金属 ABC 转运子 (ATP-binding cassette transporter) 正是肺炎链球菌从外界环境获得离子的必要工具^[21]。转运子 (pit1 或 pit2) 的突变株在离子缺陷性培养基中生长速度减慢, 对离子依赖性抗生素链黑菌素 (Streptonigrin) 的敏感性降低, 在肺炎链球菌全身感染模型中的毒力减弱。经同源性查找发现, 9[#] 片段与 ABC 转运子具有相似性, 故其可能在 SS2 的致病过程中发挥了作用。

目前对 SS2 毒力因子的研究已较为深入, 本课题组已报道的毒力因子有 MRP^[22]、EF^[23] 和溶血素^[24]等, 此外还检出了毒力相关基因 orf2^[8], 但迄今为止尚未发现可明确区分 SS2 的毒力株、弱毒力株及无毒力株的标志因子。此 5 个片段的发现, 将为用 PCR 方法检测 SS2 不同毒力菌株奠定良好的基础。首次发现的这 5 个片段在 SS2 致病过程中所起到的作用, 有待于今后的研究。

参 考 文 献

- [1] Higgins R , Gottschalk M . Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1993 . *Can Vet J* , 1994 **35** (4) : 245 .
- [2] Higgins R , Gottschalk M . Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1994 . *Can Vet J* , 1995 **36** (5) : 320 .
- [3] Vecht U , Wisselink H J , van Dijk J E , et al . Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype . *Infect Immun* , 1992 **60** (2) : 550 - 556 .
- [4] Vecht U , Wisselink H J , Jellema M L , et al . Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2 . *Infect Immun* , 1991 **59** (9) : 3156 - 3162 .
- [5] Arends J P , Hartwig N , Rudolph M , et al . Carrier rate of *Streptococcus suis* capsular type 2 in palatine tonsils of slaughtered pigs . *J Clin Microbiol* , 1984 **20** (5) : 945 - 947 .
- [6] Clifton-Hadley F A , Alexander T J , Upton I , et al . Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs . *Vet Rec* , 1984 , **114** (21) : 513 - 518 .
- [7] van Leengoed L A , Vecht U , Verheyen E R . *Streptococcus suis* type 2 infections in the Netherlands (part two) . *Vet Q* , 1987 **9** (2) : 111 - 117 .
- [8] 李干武 , 姚火春 , 陆承平 . 在猪链球菌 2 型江苏分离株中发现新的 *orf2* 毒力相关基因 . *农业生物技术学报* , 2003 , **11** (3) : 295 - 298 .
- [9] Luque I , Tarradas C , Astorga R , et al . The presence of muramidase released protein and extracellular factor protein in various serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased and healthy pigs in Spain . *Res Vet Sci* , 1999 **66** (1) : 69 - 72 .
- [10] Staats J J , Plattner B L , Stewart G C , et al . Presence of the *Streptococcus suis* sulfolysin gene and expression of MRP and EF correlates with high virulence in *Streptococcus suis* type 2 isolates . *Vet Microbiol* , 1999 **70** (3 - 4) : 201 - 211 .
- [11] 姚火春 , 陈国强 , 陆承平 . 猪链球菌 1998 年分离株病原特性鉴定 . *南京农业大学学报* , 1999 **22** (2) : 67 - 70 .
- [12] Smith H E , Rijnsburger M , Stockhofe-Zurwieden N , et al . Virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 1 can be recognized by a unique ribotype profile . *J Clin Microbiol* , 1997 **35** (5) : 1049 - 1053 .
- [13] Radnedge L , Gamez-Chin S , McCready P M , et al . Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis* . *Appl Environ Microbiol* , 2001 **67** (8) : 3759 - 3762 .
- [14] Janke B , Dobrindt U , Hacker J , et al . A subtractive hybridisation analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* K-12 strain MG1655 . *FEMS Microbiol Lett* , 2001 **199** (1) : 61 - 66 .
- [15] Sawada K , Kokeguchi S , Hongyo H , et al . Identification by subtractive hybridization of a novel insertion sequence specific for virulent strains of *Porphyromonas gingivalis* . *Infect Immun* , 1999 , **67** (11) : 5621 - 5625 .
- [16] Parsons Y N , Panagea S , Smart C H , et al . Use of subtractive hybridization to identify a diagnostic probe for a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* . *J Clin Microbiol* , 2002 **40** (12) : 4607 - 4611 .
- [17] Bayer A S , Coulter S N , Stover C K , et al . Impact of the high-affinity proline permease gene (*putP*) on the virulence of *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis . *Infect Immun* , 1999 , **67** (2) : 740 - 744 .
- [18] Hava D L , Hemsley C J , Camilli A , et al . Transcriptional regulation in the *Streptococcus pneumoniae* *rhrA* pathogenicity islet by RlrA . *J Bacteriol* , 2003 **185** (2) : 413 - 421 .
- [19] Lizewski S E , Lundberg D S , Schurr M J . The transcriptional regulator AlgR is essential for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis . *Infect Immun* , 2002 **70** (11) : 6083 - 6093 .
- [20] Lyon W R , Gibson C M , Caparon M G . A role for trigger factor and rgg-like regulator in the transcription , secretion and processing of the cysteine proteinase of *Streptococcus pyogenes* . *EMBO J* , 1998 **17** (21) : 6263 - 6275 .
- [21] Brown J S , Gilliland S M , Ruiz-Albert J , et al . Characterization of *pit* , a *Streptococcus pneumoniae* iron uptake ABC transporter . *Infect Immun* , 2002 **70** (8) : 4389 - 4398 .
- [22] 曾巧英 , 陆承平 . 猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白诱导上皮细胞融合和凋亡 . *微生物学报* , 2003 **43** (3) : 407 - 412 .
- [23] 欧 瑜 , 陆承平 . 猪链球菌 2 型国内分离株毒力相关蛋白的分析 . *微生物学报* , 2002 **42** (1) : 94 - 97 .
- [24] 方绍庆 , 陆承平 . 猪链球菌 2 型溶血素的化学修饰 . *微生物学报* , 2003 **43** (3) : 395 - 399 .

Found of Putative Virulent Genes of *Streptococcus suis* Type 2 StrainsTIAN Yun¹ Frank M Aarestrup² LU Cheng-Ping^{1*}⁽¹⁾ College of Veterinary Medicine , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)⁽²⁾ Danish Institute for Food and Veterinary Research , Copenhagen , DK-1970 Copenhagen V , Denmark)

Abstract : *Streptococcus suis* type 2 (SS2) infections have become one of the important problems in all over the world . SS2 strains can be divided into three kinds , which are virulent , weakly virulent and avirulent strains . But up to now no rapid and efficient methods are found to distinguish these three kinds of strains . In order to find the gene sequence unique to the virulent strains , suppression subtractive hybridization (SSH) was used between virulent strain HA9801 and avirulent strain 12 . Five fragments of putative virulent genes were found by this method and they were transcriptional regulators , amino acid permease , ABC transporter and cell surface anchored protein which were the first report in China and foreign countries . These five new fragments will be useful for the detection of SS2 virulent strains .

Key words : *Streptococcus suis* type 2 , Suppression subtractive hybridization (SSH) , Putative virulent genes

Foundation item : Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G1999011906) ; Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (2002307034)

* Corresponding author . Tel/Fax : 86-25-84396517 ; E-mail : lucp@njau.edu.cn

Received date : 12-19-2003