

高致病性 2 型猪链球菌 IV 型样分泌系统 *virB1-89K* 基因的敲除及其对毒力的影响

钟秋, 李明, 赵岩, 陈恬, 殷素鹏, 王敏, 饶贤才, 谭银玲, 胡福泉*

第三军医大学基础部微生物学教研室, 重庆 400038

摘要: 【目的】构建高致病性 2 型猪链球菌 IV 型样分泌系统 *virB1-89K* 基因的敲除株和互补株, 研究 *virB1-89K* 基因缺失对细菌毒力的影响。【方法】通过同源重组技术敲除 *virB1-89K* 基因, 多重 PCR 筛选敲除株并测序鉴定。再将 *virB1-89K* 基因克隆到穿梭质粒 pSET1 后转入 *virB1-89K* 敲除株中, 构建互补株。比较野生株 05ZYH33、突变株 $\Delta virB1-89K$ 和互补株 *CvirB1-89K* 三者基本生物学特性的差异, 小鼠实验分析 *virB1-89K* 基因敲除后对细菌毒力的影响。【结果】成功构建突变株 $\Delta virB1-89K$ 和互补株 *CvirB1-89K*, 在基本生物学性状无明显改变的情况下, 敲除株的毒性降低到野生株的 30%, 互补株可恢复其毒性。【结论】*virB1-89K* 基因作为 2 型猪链球菌高致病性菌株 05ZYH33 的 IV 型样分泌系统的重要组分, 与其高致病性密切相关。

关键词: 2 型猪链球菌, IV 型样分泌系统, *virB1* 基因, 基因敲除

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 03-0276-08

2 型猪链球菌 (*Streptococcus suis* serotype 2, SS2) 是一种重要的人畜共患传染病病原菌, 它不仅会导致猪出现急性败血症、脑膜炎、关节炎、心内膜炎及急性死亡, 还可以通过伤口和呼吸道等传播途径, 导致人的感染^[1]。既往国内外报道人感染 SS2 均为散发病例, 且临床表现多为败血症或脑膜炎, 愈后较好。然而, 1998 年和 2005 年我国江苏和四川两省分别爆发的大规模 SS2 感染猪和人的公共卫生事件, 病人中出现高比例的链球菌中毒性休克综合征 (Streptococcal toxic shock syndrome, STSS), 临床表现为高热、休克、多器官衰竭, 病程短而凶险, 病死率高达 62.7% - 81.3%, 引发严重的公共卫生事件, 受到了国内外高度关注^[2-3]。目前, 对高致病

性 SS2 引发 STSS 的机制尚不清楚。

为了对造成这两次重大公共卫生事件的 SS2 流行菌株的高致病性进行深入研究, 本课题组前期通过全基因组测序和比较基因组学分析, 发现一个 89K 毒力岛 (PAI89K) 是引起两次大爆发的 SS2 菌株所特有的^[4]。对 PAI89K 进一步研究, 发现其 5' 端编码了一个 IV 型样分泌系统 (type IV-like secretion system, T4SS-like)^[5]。T4SS 是与细菌接合机制有关的一种分泌系统, 在革兰阳性菌和革兰阴性菌中都有存在。T4SS 具有广泛的分泌底物, 包括单个的蛋白, 蛋白-蛋白复合体, 蛋白-DNA 复合体。一方面它能够通过接合作用介导基因水平转移, 在细菌间传递抗性基因和毒力基因, 有利于细菌进

基金项目: 国家自然科学基金 (30901282)

* 通信作者。Tel: +86-23-68752834; E-mail: hufuquan2009@yahoo.cn

作者简介: 钟秋 (1988 -), 女, 重庆人, 硕士研究生。E-mail: cinderellaqiu@163.com

收稿日期: 2012-11-19; 修回日期: 2012-12-26

化;另一方面, T4SS 还可跨膜转运效应蛋白分子并将其注入宿主靶细胞, 直接参与细菌致病过程^[6-7]。根据生物信息学分析, 发现 PAI89K 上的 T4SS-like 系统编码组分分别与根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) VirB/D4 系统的 VirB1、VirB4、VirB6 和 VirD4 蛋白具有一定的相似性。因此, 我们将 PAI89K 上 T4SS-like 系统的各组分分别命名为 VirB1-89K、VirB4-89K、VirB6-89K 和 VirD4-89K。大量文献表明, VirB1 参与致病细菌毒力因子的释放, 在细菌致病过程中发挥了重要的作用^[8]。因此, 本研究拟通过同源重组技术构建 *virB1-89K* 基因缺失的 SS2 敲除菌株, 研究 *virB1-89K* 与 SS2 高致病性之间的关系, 揭示 T4SS-like 系统在高致病性 SS2 中的生物学作用。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒、引物、实验动物及培养方法

本实验所用的菌株、质粒及引物见表 1、2, 引物由华大基因合成。BALB/c 品系小鼠购自本校实验动物中心, 雌性, 4-5 周龄 (15 g 左右), SPF 级。SS2 培养于 THY 培养基即 Todd-Hewitt-Broth (THB) 培养基 (购于 Difco 公司) 加 2% 酵母提取物。微孔板检测仪 (酶标仪) SpectraMax M2/M2e 购于 Molecular Devices 公司。大肠埃希菌培养于 LB 培养基。所用抗生素浓度分别为: 壮观霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 四环素 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 氯霉素 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 本实验所用菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Bacterial strains/plasmids	Characteristics/function	Source
<i>S. suis</i> 05ZYH33	Virulent strain of SS2 isolated from patients with a toxic shock-like syndrome	Collected in our laboratory
<i>S. suis</i> Δ <i>virB1-89K</i>	The deletion mutant of <i>virB1-89K</i> with background of 05ZYH33, Spc^r	In this study
<i>S. suis</i> <i>CvirB1-89K</i>	Complemented strain of <i>virB1-89K</i> ; Spc^r ; Cm^r	In this study
<i>E. coli</i> DH5 α	Cloning host for maintaining the recombinant plasmids	Collected in our laboratory
pMD19-T	Cloning vector; Amp^r	TaKaRa
pUC18	Cloning vector; Amp^r	TaKaRa
pUC18-LARA	A recombinant vector with the background of pUC18, designed for knockout of <i>virB1-89K</i> ; Amp^r ; Spc^r	In this study
pSET1	<i>E. coli-S. suis</i> shuttle vector; Cm^r	Collected in our laboratory
pSET1- <i>virB1-89K</i>	pSET1 inserted with the intact <i>virB1-89K</i> gene and the upstream promoter; Cm^r ; Spc^r	In this study
pSET2	<i>E. coli-S. suis</i> shuttle vector; Spc^r	Collected in our laboratory

Note: Amp^r , ampicillin resistant; Cm^r , chloromycetin resistant; Spc^r , spectinomycin resistant

表 2 本实验所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequence of primers (5'→3')	Restriction sites
spe-F	<u>GGATCCGTTTCTAAAATCTGATT</u>	<i>Bam</i> H I
spe-R	<u>CTGCAGGTTTCGTGAATACATGTTA</u>	<i>Pst</i> I
LA-F	<u>GAATTCCTATGGGAAACGAGGTA</u>	<i>Eco</i> R I
LA-R	<u>GGATCCAAAAAGGATATGCTAACAA</u>	<i>Bam</i> H I
RA-F	<u>CTGCAGACTTGCATTAACCTACCTGT</u>	<i>Pst</i> I
RA-R	<u>AAGCTTATCCGAATTTCTCTTGCTCT</u>	<i>Hind</i> III
inside-F	TAGGCATACCCCATACCGTCAC	
inside-R	AGGGCTGGCTCTCACTCAATG	
out-F	GACTACGACGAATACTACTT	
out-R	TTTGGTGGGAGAGCTATTGA	
sly-F	<u>CTGCAGGAAGCTACTCGGGG</u>	<i>Pst</i> I
sly-R	<u>GGATCCGTTTATCTCTTCAT</u>	<i>Bam</i> H I
virB1-F	<u>GGATCCTTGAAGGCAACAGGGCCGCT</u>	<i>Bam</i> H I
virB1-R	<u>GAATTCCTTGGCGACCTCCTTGATTTA</u>	<i>Eco</i> R I

1.2 生物信息学分析

利用美国国家生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 上所提供的蛋白质相似性比对工具 (basic local alignment search tool, BLAST) 对 89K 毒力岛上的 VirB1-89K 组分 (编码基因为 05SSU0968) 进行检索分析, 再运用 Pfam 软件 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 预测其功能。

1.3 基因敲除株及互补株的构建

1.3.1 敲除质粒的构建: 以 05ZYH33 野生株基因组为模板, 分别扩增 *virB1-89K* 左右两侧约 1100bp 大小的同源片段。以质粒 pSET2 为模板, *spc-F/spc-R* 为引物, 扩增 *spc^r* 基因, 然后依次克隆到 pUC18 中, 形成一个 *spc^r* 两侧具有 *virB1-89K* 上下游同源臂的敲除质粒 pUC18-LARA^[9], 如图 1 所示。

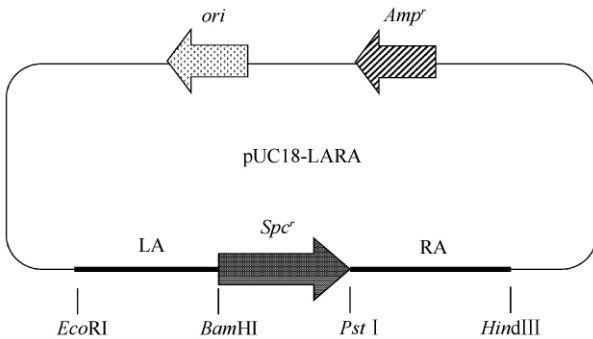


图 1 *virB1-89K* 基因敲除质粒 pUC18-LARA 示意图

Fig. 1 Construction of the gene knockout vector pUC18-LARA. Strategy for deletion mutagenesis of *virB1-89K* by allelic replacement with a spectinomycin resistance cassette (*spc^r*). LA and RA represent the upstream and downstream region of the *virB1-89K* gene respectively.

1.3.2 *virB1-89K* 敲除株的筛选和鉴定: 参考 Smith^[10] 的方法制备 05ZYH33 的感受态细胞。在 25 μ F, 2.25 kV, 200 Ω 参数条件下, 将敲除质粒 pUC18-LARA 电转到 05ZYH33 感受态细胞内, 并涂板于 Spc 抗性的 THY 平板上, 挑取平板上的单菌落用 *virB1-89K* 内部引物 inside-F/inside-R 进行 PCR 初筛, 再将可疑的突变菌株进行多重交叉 PCR 并将 PCR 产物送测序鉴定。

1.3.3 互补质粒的构建: 以 05ZYH33 为模板, 分别扩增 SS2 的 *sly* 基因启动子和 *virB1-89K* 基因, 分别克隆到 pSET1 的 *Pst* I/*Bam* H I 和 *Bam* H I/*Eco* R I 多克隆位点处, 即将 *virB1-89K* 基因置于 *sly* 启动子之下, 即为构建的互补质粒 pSET1-*virB1-89K*。

1.3.4 互补株的构建: 将构建好的互补质粒电转入 *virB1-89K* 缺失株感受态细胞中, 用 Cm 和 Spc 双重抗性平板初筛互补株, 并进行 PCR 验证, 获得互补株 *CvirB1-89K*。

1.4 野生株、基因敲除株及互补株基本生物学性状的比较

1.4.1 生长速率的比较: 在相同培养条件下, 挑取野生株 05ZYH33、突变株 Δ *virB1-89K* 和互补株 *CvirB1-89K* 单菌落, 分别接种于 5 mL THY 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 18 h, 次日取过夜菌液测 OD_{600} 。用 THY 培养基将三者稀释成相同的浓度。接种于 0.5 mL 的 THY 中, 用酶标仪每 2 h 测一次 OD_{600} 并绘制生长曲线, 比较三者有无差异。

1.4.2 形态结构的比较: 将 05ZYH33、 Δ *virB1-89K* 和 *CvirB1-89K* 培养于含有 10% 胎牛血清的 THY 中至 $OD_{600} = 0.8 - 1.0$ 后, 进行革兰染色和荚膜鞣酸染色, 于显微镜下观察细菌形态有无差异。

1.4.3 溶血性的比较: 将 05ZYH33、 Δ *virB1-89K* 和 *CvirB1-89K* 用三线法分别接种于 THY 琼脂血平板上 (含 6% 山羊血), 于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 - 36 h, 观察菌落形态和溶血活性有无差异。

1.5 动物实验

参考赵岩^[11] 的方法, 从平板上分别挑取 05ZYH33、 Δ *virB1-89K* 和 *CvirB1-89K* 单菌落, 于 THY 培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 18 - 24 h。以 1:100 传代接种于新鲜的不含抗性的 THY 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 静置培养至 $OD_{600} = 1.0$ (5.0×10^8 CFU/mL), 再用新鲜的培养基将菌液稀释 5 倍 (即菌液为 10^8 CFU/mL)。通过腹腔注射的方法, 取三种菌株各 1 mL 分别攻击 BALA/c 小鼠, 每组 10 只。密切观察动物感染后的体征, 比较各组小鼠的发病情况及存活时间的差异。

2 结果

2.1 生物信息学分析

氨基酸同源性比对结果表明, VirB1-89K 与根癌农杆菌 VirB1 蛋白相似性不高, 如表 3 所示。为了进一步确定 *virB1-89K* 基因的功能, 我们又对 VirB1-89K 进行了蛋白结构域分析 (图 2)。结果显示: 在 VirB1-89K 上除了有一个跨膜区以外, 还存在一个 CHAP 功能域。该结构域在细菌中主要执行水

解细胞壁肽聚糖的功能。这与根瘤农杆菌中 VirB1 蛋白裂解肽聚糖中 β -1,4 糖苷键, 生成 β -1,6 糖苷键有相似之处。此外, 本课题组前期通过实验证实, 89K 毒力岛上的 T4SS-like 系统所在的编码区

05SSU0968-05SSU0982 这 15 个基因是共转录的, 提示 05SSU0968 (*virB1-89K*) 基因很有可能就是 *virB1-like* 基因。

表 3 2 型猪链球菌与根瘤农杆菌 IV 分泌系统同源性比较

Table 3 The homologous components of T4SS in *A. tumefaciens* and *S. suis* 2

The components of T4SS in <i>A. tumefaciens</i>	The components of T4SS-like in <i>S. suis</i> 2	Similarity (aa)
VirB1	VirB1-89K	10.3%
VirB4	VirB4-89K	9.64%
VirB6	VirB6-89K	13.62%
VirD4	VirD4-89K	41.67%

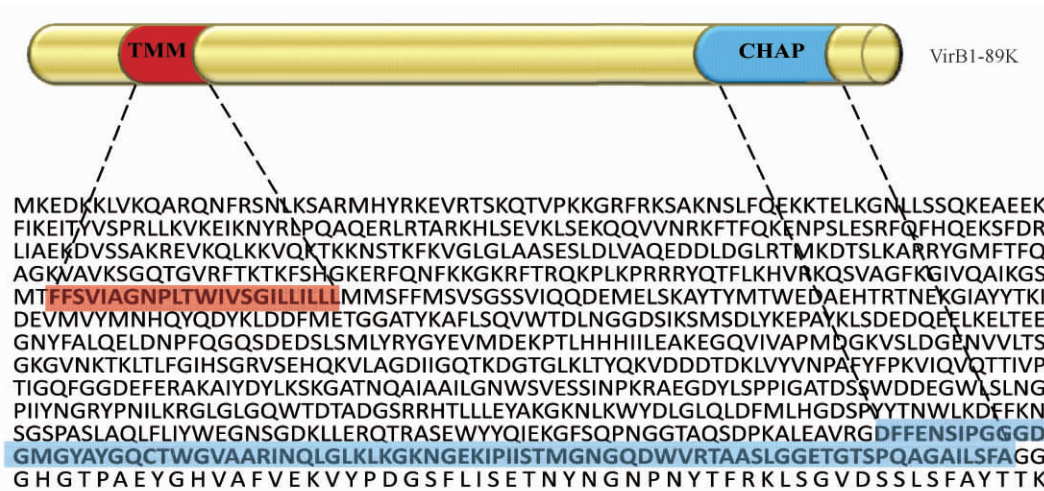


图 2 *VirB1-89K* 蛋白结构域分析

Fig. 2 The analysis of the domain of *VirB1-89K*. The transmembrane region and the functional domain of *VirB1-89K* are shown in red and blue respectively.

2.2 *virB1-89K* 基因敲除株和互补株的构建

为了更好的研究 *virB1-89K* 的生物学作用, 我们将构建好的敲除质粒 pUC18-LARA 电转化 05ZYH33 感受态细胞, 于 Spc 抗性的平板上初筛敲除突变株, 分别用 7 对引物进行 PCR 鉴定, 结果如图 3 所示, 在 *virB1-89K* 敲除株中未能有 *virB1-89K* 内部引物扩出, 而是被大小为 1100 bp 左右的 *spc'* 基因所取代, 且多重 PCR 排除了单交换的可能。再以野生株和突变株基因组为模板, 以 out-F/out-R 为引物扩增产物克隆到 pMD19-T 载体后送往华大基因测序, 结果也显示 *virB1-89K* 被 *spc'* 基因替代。

为了进一步证实 *virB1-89K* 的功能, 我们将构建的互补质粒 pSET1-*virB1-89K* 电转化入 Δ *virB1-89K* 敲除株中, 用含氯霉素和壮观霉素双重抗性的琼脂平板筛选互补株, 最后经 PCR 证实互补株 *CvirB1-*

89K 构建成功。

2.3 野生株、基因敲除株及互补株基本生物学性状的比较结果

将野生株 05ZYH33、敲除株 Δ *virB1-89K* 和互补株 *CvirB1-89K* 接种于 THY 液体培养基 37°C 培养 48 h 后, 三者的生长速率相近, 生长情况相仿, 并无显著差异 (图 4-C)。经革兰染色后, 三者均被染成紫色, 细胞壁厚度没有明显差异。荚膜染色可见, 细菌菌体呈深红色, 荚膜则被染成了浅绿色, 三者之间并无明显差异 (图 4-B)。血平板上所观察到的三者的菌落形态和溶血环大小也都没有明显差异, 三者均长出圆形半透明、灰白色、表面光滑湿润的小菌落, 直径约为 1-2 mm, 且菌落周围能明显的观察到溶血环, 直径约为 2-3 mm (图 4-A), 提示 *virB1-89K* 基因与细菌的溶血性无直接关系。

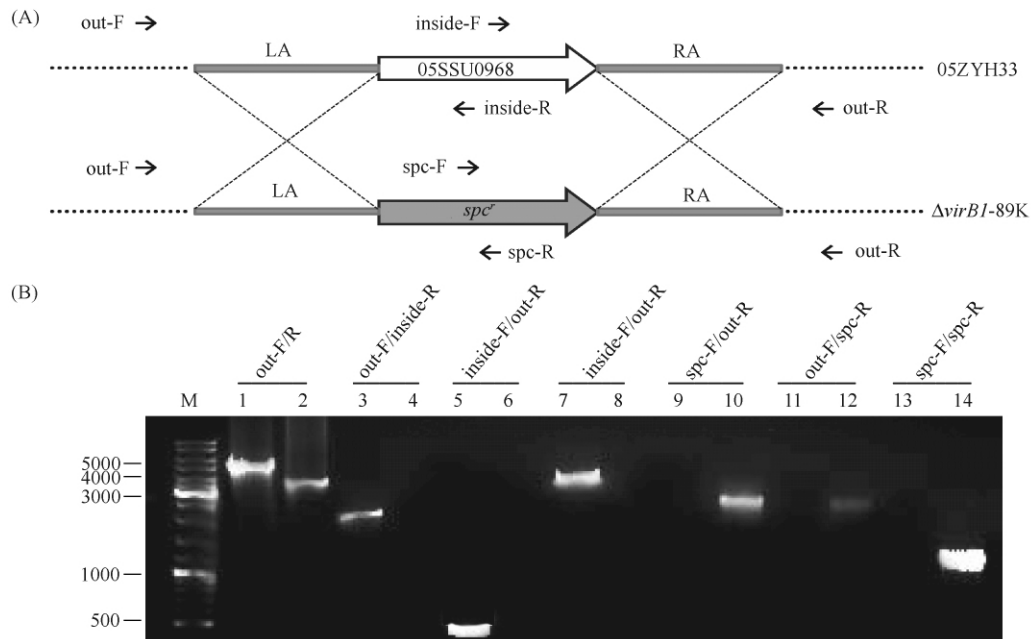


图3 敲除突变株 $\Delta virBI-89K$ 的构建及鉴定

Fig. 3 Construction and confirmation analysis of the knockout mutant strain $\Delta virBI-89K$. A: Strategy for deletion mutagenesis of *virBI-89K* by allelic replacement with a spectinomycin resistance cassette (*spc^r*); B: Confirmatory PCRs of the *virBI-89K* mutant. The primer pairs used in the multiple-PCR analysis are indicated above the lanes. Genomic DNAs from the mutant *virBI-89K* strain (lanes 1, 3, 5, 7) and the wild-type strain, 05ZYH33 (lanes 2, 4, 6, 8), were used as templates. The Gene Ruler Mix DNA ladder marker is shown to the left (M).

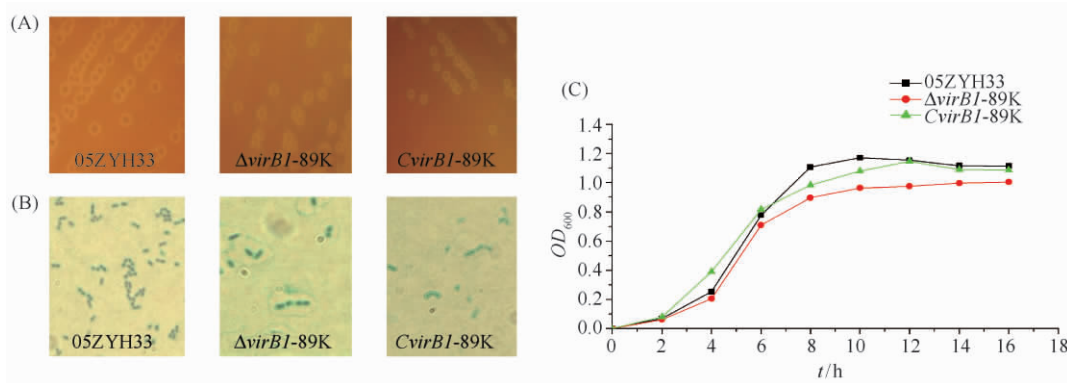


图4 野生株、基因敲除株及互补株基本生物学特征比较

Fig. 4 The basic biological characteristics of indicated *S. suis* 2 strains. A: The hemolytic characteristic of indicated *S. suis* 2 strains; B: The capsule staining of indicated *S. suis* 2 strains; C: The growth curve of indicated *S. suis* 2 strains.

2.4 动物实验结果

如图5所示,用致死剂量的野生株 05ZYH33 攻击小鼠 12 h 后,10 只小鼠全部死亡,而用相同剂量敲除株 $\Delta virBI-89K$ 攻击小鼠 12 h 后却全部存活,24 h 后仍有 8 只存活,延至 48 h 后,共死亡 3 只,存活 7 只;存活小鼠观察至 7 天实验结束时,均未发现

有任何发病症状。互补株 *CvirBI-89K* 的情况与野生株基本吻合,24 h 后小鼠全部死亡。统计学分析显示突变株感染组与野生株感染组的存活率有显著差异 ($P < 0.05$),表明 *virBI-89K* 与细菌的致病性相关。

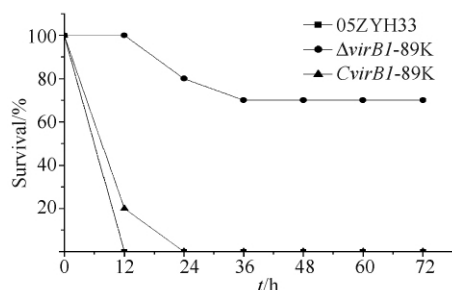


图5 *S. suis* 2 野生株 05ZYH33、敲除株 $\Delta virB1-89K$ 、互补株 *CvirB1-89K* 感染小鼠后的存活曲线

Fig. 5 Survival curves of mice infected with indicated *S. suis* 2 strains.

3 讨论

1998年和2005年在中国爆发两起SS2感染人的重大公共事件以来,其特有的STSS高致病性和高致死率引起了社会各界的高度重视,但其致病机制至今尚未完全阐明。为了对我国高致病性SS2进行研究,本课题组于2007年对这两次爆发流行的菌株进行了全基因组测序和注释,并发现这两株SS2含有一个独特的PAI89K,因此高度怀疑与SS2的高致病性密切相关。通过进一步研究发现,PAI89K上存在一个T4SS-like系统,它不仅参与到介导PAI89K的水平转移过程,在介导炎性因子大量释放引发STSS的过程中也起到了至关重要的作用^[11],为我们研究SS2高致病性提供了新的线索。

细菌分泌系统目前发现至少有7种,但只有T4SS能贯穿广泛的原核界,在革兰阳性菌、革兰阴性菌、无细胞壁的细菌以及古细菌中都存在^[12]。T4SS包括以根癌农杆菌VirB/D4为代表的IVA亚型,以嗜肺军团菌Dot/Icm为代表的IVB亚型,以及与细菌基因组岛相关的GI亚型等。其功能主要是摄取和释放一些裸露的DNA,传播基因和基因组岛,转运效应分子到宿主细胞内。在根癌农杆菌VirB/D4系统中,VirB1作为一种胞质蛋白,除了具有促进菌毛亚单位形成的功能之外^[13],主要是通过裂解GlcNAc和MurNAc之间的 $\beta-1,4$ 糖苷键分解细胞壁肽聚糖,为效应分子的转移和表面结构的装配提供通道^[14-15]。敲除根癌农杆菌*virB1*基因后,细菌的毒力下降到野生株的1% - 10%^[16-17];R1质粒中,根癌农杆菌*virB1*的同源体P19缺失株使得

R17噬菌体的感染能力降低90%^[18];pKM101质粒中,同源体*traL*缺失株毒力降低到野生株的5%^[19]。这提示在89K上的*virB1-89K*基因可能同样具有打孔、帮助毒力因子转运的作用,但是同源性比对结果显示*virB1-89K*与根癌农杆菌中的*virB1*基因相似性不高,这使得我们对*virB1-89K*的真实身份和功能深感兴趣。

为了验证我们的假设,我们构建了*virB1-89K*基因的敲除株和互补株。实验结果显示:当敲除*virB1-89K*基因后,细菌的基本生物学特性(即生长情况,荚膜形态、溶血性等)并没有发生明显改变,这说明*virB1-89K*基因并不是影响细菌基本形态和细菌维持基本生命活动所必需的,而可能与满足其额外的功能(如毒力、抗生素抵抗)等相关。用相同剂量的三个菌株分别感染小鼠时,*virB1-89K*敲除株的致死率降低了70%;而在功能互补实验中,将*virB1-89K*基因重新导入到敲除株后,细菌的致死率又恢复到野生株的100%。这个实验结果与我们设想的T4SS-like中*virB1-89K*具有打孔作用,帮助效应分子释放的假设是吻合的。与此同时,我们对VirB1-89K进行了蛋白功能的预测,分析结果表明VirB1-89K含有一个CHAP功能域,此功能域是作用于细胞壁肽聚糖的一种水解酶,这也提示我们VirB1-89K确实具有打孔的作用。所以当*virB1-89K*基因被敲除后,T4SS-like的通道结构不能有效的建立,效应分子不能释放到细菌细胞外发挥作用,实验结果才能观察到细菌的毒力显著下降。但是未释放的效应分子堆积在细胞的哪个位置?是细胞内还是细胞周质以及VirB1-89K与哪些蛋白存在相互作用等一系列问题还需要进一步的探究。接下来本课题组将针对VirB1-89K蛋白的酶学功能进行验证,并对其晶体结构进行解析,对比革兰阴性菌VirB1结构上的差异,也为揭示T4SS-like在89K上的作用机制以及SS2高致病性的研究奠定理论基础。

参考文献

- [1] Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM. *Streptococcus suis*: past and present. *Veterinary Research Communications*, 1997, 21: 381-407.
- [2] Tang J, Wang C, Feng Y, Yang W, Song H, Chen Z, Yu H, Pan X, Zhou X, Wang H, Wu B, Zhao H, Lin Y, Yue J, Wu Z, He X, Gao F, Khan AH, Wang J, Zhao

- GP, Wang Y, Wang X, Gao GF. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS medicine*, 2006, 3: e151.
- [3] Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Animal health research reviews*, 2007, 8: 29-45.
- [4] Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, Wang J, Zheng F, Pan X, Liu D, Li M, Song Y, Zhu X, Sun H. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS One*, 2007, 2: e315.
- [5] Li M, Shen X, Yan J, Han H, Zheng B, Liu D, Cheng H, Zhao Y, Rao X, Wang C, Tang J, Hu F, Gao GF. GI-type T4SS-mediated horizontal transfer of the 89K pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis* serotype 2. *Molecular microbiology*, 2011, 79: 1670-1683.
- [6] Fronzes R, Christie PJ, Waksman G. The structural biology of type IV secretion systems. *Microbiology*, 2009, 7: 703-714.
- [7] Terradot L, Waksman G. Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag-type IV secretion system. *The FEBS journal*, 2011, 278: 1213-1222.
- [8] Hoppner C, Liu Z, Domke N, Binns AN, Baron C. VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology*, 2004, 186: 1415-1422.
- [9] Li M, Wang C, Feng Y, Pan X, Cheng G, Wang J, Ge J, Zheng F, Cao M, Dong Y, Liu D, Lin Y, Du H, Gao GF, Wang X, Hu F, Tang J. SalK/SalR, a two-component signal transduction system, is essential for full virulence of highly invasive *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS One*, 2008, 3: e2080.
- [10] Smit HE, Wisselink HJ, Vecht U, Gielkens AL, Smits MA. High-efficiency transformation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2. *Microbiology*, 1995, 141 (Pt 1): 181-188.
- [11] Zhao Y, Liu G, Li S, Wang M, Song J, Wang J, Tang J, Li M, Hu F. Role of a type IV-like secretion system of *Streptococcus suis* 2 in the development of streptococcal toxic shock syndrome. *The Journal of infectious diseases*, 2011, 204: 274-281.
- [12] Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annual review of microbiology*, 2005, 59: 451-485.
- [13] Zupan J, Hackworth CA, Aguilar J, Ward D, Zambryski P. VirB1^{*} promotes T-pilus formation in the vir-Type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology*, 2007, 189: 6551-6563.
- [14] Lloa M, Zupan J, Baron C, Zambryski P. The N- and C-terminal portions of the *Agrobacterium* VirB1 protein independently enhance tumorigenesis. *Journal of bacteriology*, 2000, 182: 3437-3445.
- [15] Scheurwater E, Reid CW, Clarke AJ. Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2008, 40: 586-591.
- [16] Berger BR, Christie PJ. Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *Journal of bacteriology*, 1994, 176: 3646-3660.
- [17] Mushegian AR, Fullner KJ, Koonin EV, Nester EW. A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 93: 7321-7326.
- [18] Bayer M, Eferl R, Zellnig G, Teferle K, Dijkstra A, Koraimann G, Högenauer G. Gene 19 of plasmid R1 is required for both efficient conjugative DNA transfer and bacteriophage R17 infection. *Journal of bacteriology*, 1995, 177: 4279-4288.
- [19] Winans SC, Walker GC. Conjugal transfer system of the IncN plasmid pKM101. *Journal of bacteriology*, 1985, 161: 402-410.

Construction and virulence evaluation of the *virB1-89K* gene knockout mutant of type IV-like secretion system of *Streptococcus suis* serotype 2

Qiu Zhong, Ming Li, Yan Zhao, Tian Chen, Supeng Yin, Min Wang, Xiancai Rao, Yinling Tan, Fuquan Hu*

Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: [Objective] To construct the *virB1-89K* gene knockout mutant and its complementary strain of *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) highly virulent strain 05ZYH33 and evaluate the role of *virB1-89K* in the pathogenesis of SS2. [Methods] The *virB1-89K* gene was knocked out by homologous recombination, then multiple-PCR and sequence analysis were used to identify the knockout strain $\Delta virB1-89K$. The *virB1-89K* gene and its upstream promoter were cloned into the *E. coli-S. suis* shuttle vector pSET1, and the recombinant plasmid was electrotransformed into the $\Delta virB1-89K$ mutant to generate the complementary strain *CvirB1-89K*. The effects of *virB1-89K* deletion on the basic biological characteristics and virulence of SS2 were then determined in this study. [Results] The isogenic mutant $\Delta virB1-89K$ and its complementary strain *CvirB1-89K* were successfully constructed. No significant differences in biological characteristics were found among the three strains. However, the virulence of the $\Delta virB1-89K$ mutant was reduced to 30% of the wild-type level and functional complementation of *virB1-89K* restored its pathogenicity. [Conclusion] The *virB1-89K* gene plays an important role in the pathogenesis of *S. suis* 2 infection.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2, type IV-like secretion system, *virB1* gene, knockout

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30901282)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-68752834; E-mail: hufuquan2009@yahoo.cn

Received: 19 November 2012/Revised: 26 December 2012

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件, 作者在修改时, 如果对“作者或单位的署名”进行变更, 与最初的投稿不同, 本刊要求: 作者必须再提供有关证明, 否则不能生效! 此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>), 在首页内、“常见问题”中有显示, 点开左侧的“署名”, 其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序, 需要原研究内容所属单位 (通常是第一署名单位) 的证明信, 证明内容: 原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序, 需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容: 原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部 (邮寄原件或扫描后 E-mail 发来), 新的变更即可生效。