

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (5) :643 - 649; 4 May 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140388

猪链球菌 2 型 IV 型分泌系统组分 VirD4 与毒力相关性分析

王俊平^{1#}, 郑玉玲^{1#}, 骈亚亚¹, 郭洁², 郝淮杰², 姜永强^{1*}

¹军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

²中国科学院微生物研究所, 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

摘要: 【目的】构建猪链球菌 2 型强毒株 05ZYH33 毒力岛 89 K 上的 IV 型分泌系统组分 VirD4 敲除突变株, 初步分析其活性和毒力, 为进一步研究猪链球菌 2 型在逃避宿主天然免疫杀伤中的作用提供基础。【方法】以 05ZYH33 基因组为模板, PCR 扩增 VirD4 基因上下游同源臂, 以穿梭质粒 pSET1 为模板, PCR 扩增氯霉素抗性基因 Cm, 通过重叠 PCR 技术搭建上述 3 个片段并连接至温敏载体 pSET4s, 构建基因敲除载体 pSET4s::VirD4; 通过同源重组构建基因敲除突变株 Δ VirD4; 通过体外全血杀伤实验、CD1 小鼠竞争感染及攻毒实验对突变株和野生株的毒力进行比较分析。【结果】获得了基因敲除突变株 Δ VirD4, 通过对比发现其毒力与野生株相比有所降低。【结论】猪链球菌 2 型 IV 型分泌系统组分 VirD4 与其毒力相关, 并在早期抵抗天然免疫细胞杀伤中发挥一定作用。

关键词: 猪链球菌 2 型, 89 K 毒力岛, IV 型分泌系统, 毒力

中图分类号: R392 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 05-0643-07

猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis* serotype 2, *S. suis* 2, SS2) 是一种重要的人兽共患病病原菌, 能引起人和猪的脑膜炎、心内膜炎、关节炎、肺炎、菌血症以及突发性死亡^[1]。1998 年和 2005 年在我国江苏和四川两地局部地区暴发了较大规模的猪及人感染猪链球菌的病例, 不但造成猪的大量死亡, 而且累计报告人感染猪链球菌病例 204 例, 其中死亡 38 例^[2], 不仅给人类和养猪业带来巨大威胁, 而且也是一起严重社会公共卫生安全问题。特别是这两次猪链球菌暴发不仅引起菌血症和脑膜炎, 而且重症患者还多表现为链球菌中毒性休克综合征 (STSS)。毒力因子在 *S. suis* 2 感染中起关键作用, 目前文献报道的毒力因子包括: 溶菌酶释放蛋白

(muramidase-released protein, MRP) 和胞外因子 (extra-cellular protein factor, EF)^[3-4]、溶血素 (suilysin, SLY)^[5]、荚膜多糖 (capsule polysaccharide, CPS)^[6]、H 因子结合蛋白 (Fhb)^[7]、腺苷合成酶 (Ssads)^[8]、IV 型分泌系统 (VirD4-89K and VirB4-89K)^[9] 等, 然而由于毒力因子的复杂性和多样性, 猪链球菌 2 型的致病机制, 尤其早期抗宿主天然免疫方面的作用机制仍需不断探究。我国科研工作者对两株高致病性的猪链球菌 2 型 98HAH12 和 05ZYH33 的基因组测序比对时发现一个 89 kb 的毒力岛 PAI, 命名为 89 K, 而此 PAI 仅在中国高致病性 SS2 流行株中存在^[9]。89 K 毒力岛功能注释结果显示可能与毒力相关的基因有: 3 个

基金项目: 国家自然科学基金 (81371766, 81171528, 81401642)

* 通信作者。Tel: +86-10-66948487; E-mail: jiangyq@nic.bmi.ac.cn

作者简介: #共同第一作者。王俊平 (1978 -), 男, 硕士研究生, 主要从事细菌与宿主相互作用机制研究。E-mail: xjhtb_wjp@163.com

收稿日期: 2014-08-03; 修回日期: 2014-10-24

控制物质运输的 ABC transporter, 2 个双组分调控系统 (TCS), 3 个 IV 型分泌系统 (T4SS) 的组件。T4SS 是接触依赖性分泌系统, 被该系统转运的都是一些大分子物质, 如核蛋白颗粒、多个亚单位毒素等, 涉及多种病理生理作用。

本研究利用实验室成熟的基因敲除技术获得了 89 K 毒力岛上的 T4SS 中 VirD4 (*gene* 0973) 基因的敲除突变株 Δ VirD4, 体外全血存活模型证明 VirD4 有较强的抗吞噬作用, 体内动物模型证明 VirD4 是猪

链球菌 2 型的一个新毒力因子, 为进一步研究 T4SS 在猪链球菌 2 型抗宿主天然免疫细胞杀伤中的作用提供重要实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与引物: 本研究所用菌株、质粒及引物见表 1。

表 1. 本研究所用菌株、质粒与引物

Table 1. Bacterial strains and plasmids and primers used in this study

Strain, plasmid, or primer	Description ^a or sequence ^b	Source or PCR product
<i>E. coli</i> DH5 α	Host for cloning vector	In this lab
05ZYH33	Virulent Chinese <i>S. suis</i> 2 isolate	In this lab
Δ VirD4	Gene VirD4 knockout mutant strain; Cm ^R	This study
pMD18T	TA cloning vector, lacZ, Amp ^R	TaKaRa
pSET1	<i>S. suis</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector, Cm ^R	Takamatsu <i>et al.</i> (2001)
pSET4s	Gene replacement vector with MCS of pUC19, Spc ^R	Takamatsu <i>et al.</i> (2001)
pSET4s::VirD4	The gene <i>VirD4</i> knockout plasmid, Spc ^R Cm ^R	This study
VirD4 KOP1	<u>GCAGGATCCCTAGGCAAGCCTTAGCTC</u>	VirD4 gene and its upstream flanking region
VirD4 KOP2	<u>CCTCGGAACCCATCGAATTACAAATCGTTCATAGGTG</u>	VirD4 gene and its upstream flanking region
CM-F	TAATTCGATGGGTCCGAGG	Chloramphenicol resistant gene
CM-R	CACCGAAGTACAGCTTGATG	Chloramphenicol resistant gene
VirD4 KOP5	<u>CATCAAGCTCTAGTTCGGTGGAAATGGCTTCCGGATAA</u>	VirD4 gene and its downstream flanking region
VirD4 KOP6	<u>GCGGAATTTCTGGCGGTGCGATTCTAAAT</u>	VirD4 gene and its downstream flanking region
SPC-F	GTGTTTCGTGAATACATGTTATA	Spectinomycin resistant gene
SPC-R	GTTTTCTAAAATCTGATTACCA	Spectinomycin resistant gene
mrp-F	GGAGCTGAAGTTGATGCCT	A fragment of <i>mrp</i> gene
mrp-R	GGTCGTTCTCCACAATTTACAG	A fragment of <i>mrp</i> gene

^aAmp^R, ampicillin resistant; Cm^R, chloramphenicol resistant; Spc^R, spectinomycin resistant; ^bUnderlined sequences are the restriction digestion sites.

1.1.2 工程酶及试剂: Taq 酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、T4 DNA 连接酶为 TAKARA 公司产品; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒为东盛公司产品; 基因组提取试剂盒为天根生化科技公司产品; 壮观霉素 (Spc), 氯霉素 (Cm) 为 SIGMA 公司产品; THB 培养基为 Bacto 公司产品; 引物及测序由 invitrogen 公司合成; 实验用人全血来源于健康志愿者, 年龄 20 至 35 岁, 性别不限, 采用肝素抗凝。

1.2 VirD4 基因生物信息学分析

利用 Interproscan 4.0 软件对猪链球菌 2 型强毒株 05ZYH33 89 K 毒力岛上的 IV 型分泌系统组分 VirD4 氨基酸序列结构域进行预测分析。

1.3 细菌培养

将野生株 05ZYH33 的菌液通过分区划线法接

种于哥伦比亚血琼脂平板, 37°C、5% CO₂ 培养箱培养 18–24 h。然后挑取单克隆菌落接种于 THB 液体培养基, 培养 18 h 至生长稳定期, 再按 1% 的比例转接, 培养 8 h 至稳定期前期并用于后续实验, 突变株 Δ VirD4 的培养方法与野生株相同, 但培养基含 5 mg/L 氯霉素。大肠杆菌 DH5 α 培养于 LB 液体培养基, 37°C 震荡培养 (大观霉素在 LB 培养基中的浓度为 100 mg/L)。

1.4 基因敲除载体的构建

用基因组提取试剂盒提取 05ZYH33 基因组, 并以此为模板, 以 VirD4 KOP 1/2 为引物扩增上游同源臂, 以 VirD4 KOP 5/6 为引物扩增下游同源臂, 以 pSET1 载体为模板, CM-F/R 为引物扩增氯霉素抗性盒。以切胶回收的上述 3 个片段为模板, VirD4

KOP 1/6 为引物, 通过重叠 PCR 方法扩增上下游同源臂中间嵌合氯霉素抗性盒的融合片段。通过内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 同时酶切重叠片段及自杀载体

pSET4S, 接着用 T4 DNA 连接酶 16°C 连接过夜, 鉴定可通过菌落 PCR 方法。基因敲除载体 pSET4s :: VirD4 的构建及突变体的筛选如图 1 所示。

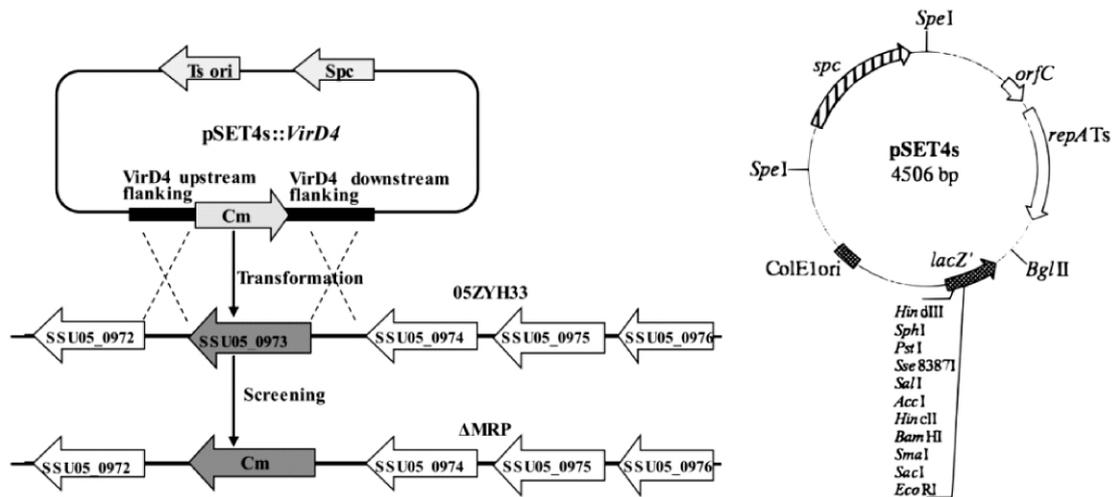


图 1. pSET4S 质粒图谱与基因敲除载体的构建示意图

Figure 1. Plasmid profile of pSET4s and construction diagram of gene knock-out vector.

1.5 电转化及失活突变株的筛选

制备猪链球菌 05ZYH33 电转化感受态细胞。将基因敲除载体 pSET4s :: VirD4 约 1 μg 加入到 100 μL 感受态细胞中, 轻微混匀后加到 2 mm 的电转杯中, 冰浴 10 min, 以 2.5 kV/cm, 200 Ω, 25 μF 电转化参数进行电击, 然后立即加入 1 mL 电转复苏液, 在 30°C, 140 r/min 空气摇床中复苏 3–4 h, 短暂离心后涂布于 THBCm^R 平板, 在 30°C、5% CO₂ 培养箱内培养 48 h, 挑选正确的克隆, 先后经 30°C 双交换和 40°C 质粒丢失, 最后通过点板的方法获得基因敲除突变株。成功敲除的突变株 Cm^R 阳性, Spc^R 阴性, SS2 鉴定引物 (MRP) 阳性, 使用 VirD4 KOP 3/4 扩增阴性, 使用 VirD4 KOP 1/6 扩增出上下游同源臂和 Cm 抗性盒的融合基因。如果 PCR 扩增结果符合上述预期表明 VirD4 基因敲除成功。

1.6 ΔVirD4 生物活性分析

将野生株 05ZYH33 和突变株 ΔVirD4 分别分区划线接种于血琼脂平板, 在 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 18 h, 观察菌落形态及溶血环大小。将野生株 05ZYH33 和突变株 ΔVirD4 稳定期菌液按 1% 比例转接, 在 37°C、5% CO₂ 培养箱内培养, 每隔 1 h 取菌液测量 OD₆₀₀, 培养至 14 h, 绘制生长曲线。

1.7 全血杀伤实验

将稳定期的野生株 05ZYH33 和突变株 ΔVirD4

菌液稀释至约 10⁴ CFU /mL, 取 50 μL 加入到 400 μL 人血中, 37°C、5% CO₂, 20 r/min 孵育 1 h, 并将原始菌量稀释合适浓度涂板计数。取出孵育后全血, 加入 50 μL 1% saponin 冰上裂解 15 min 并稀释涂板计数, 按公式 (1) 计算杀菌率。

杀菌率 (killed bacteria rate) % =

$$\frac{\text{与全血孵育 1h 后的菌落计数}}{\text{加入全血中的原始菌落计数}} \times 100\% \quad \text{公式 (1)}$$

1.8 CD1 小鼠竞争感染及攻毒实验

将野生株 05ZYH33 和突变株 ΔVirD4 稳定期前期菌液等比例混合后, 稀释 10 倍, 腹腔注射雌性、体重 (26 ± 2) g 的 CD1 小鼠 6 只, 每只 1 mL, 各自的原始菌量稀释至 10⁻⁶ 涂板计数。注射 6 h 后眼球取血, 并用无菌 PBS 稀释后涂布于 THB 和 THB Cm^R 平板, 在 37°C、5% CO₂ 培养箱内培养 18 h, 菌落计数。THB 平板生长菌落为野生株 05ZYH33 和突变株 ΔVirD4, THB Cm^R 抗性平板生长菌落则为突变株 ΔVirD4。按公式 (2) 计算竞争感染指数 (CI)。

竞争感染指数 (CI) =

$$\frac{(\text{CFU/mL}) / \text{生株 (CFU/mL)}}{\text{接种突 (CFU/mL) / 接种野生株 (CFU/mL)}}$$

公式 (2)

另取一批体重 (26 ± 2) g 的 CD1 雌性小鼠, 随机分成 3 组, 每组 10 只, 分别腹腔注射生长稳定期

前期 10 倍稀释的野生株 05ZYH33、突变株 Δ VirD4 菌液和无菌 PBS, 每只注射 1.0 mL, 并将各自原始菌液用无菌 PBS 稀释至 10^{-6} 涂板、培养、计数。注射后及时观察 CD1 小鼠的发病和存活情况。

2 结果

2.1 VirD4 基因生物信息学分析

利用 InterProScan 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools>) 对 VirD4 氨基酸序列进行预测分析, 如图 2 所示, 发现其具备典型的 T4SS 结构域特征, 但未发现其他同源结构域。

2.2 基因敲除载体的构建和鉴定

以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 用引物 VirD4

KOP 1/2, VirD4 KOP 5/6 扩增出 VirD4 上游同源臂 (512 bp) 和下游同源臂 (515 bp), 同时用引物 CM-F/R 从 pSET1 质粒中扩增出 Cm 基因 (1056 bp), 结果如图 3-A 所示。采用重叠 PCR 方法搭建上述 3 个片段, 胶回收产物如图 3-B 所示。将重叠 PCR 产物先连接到 T 载体, 转化扩增后经 BamH I 和 EcoR I 双酶切回收重叠 PCR 产物, 同时 BamH I 和 EcoR I 双酶切 pSET4s 载体并胶回收, 结果如图 3-C 所示。T4 DNA 连接酶连接上述双酶切产物, 转化 DH5 α , 菌落 PCR 鉴定阳性结果并酶切验证, 结果如图 3D 所示, 最后对重组质粒测序, 结果显示 3 个片段连接次序及序列完全正确, 说明基因敲除载体 pSET4s::VirD4 构建成功。

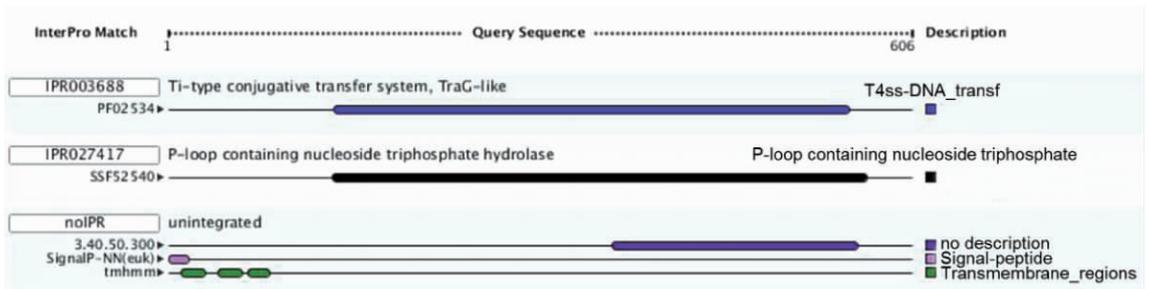


图 2. VirD4 氨基酸序列预测分析

Figure 2. Amino acid sequence prediction analysis of VirD4.

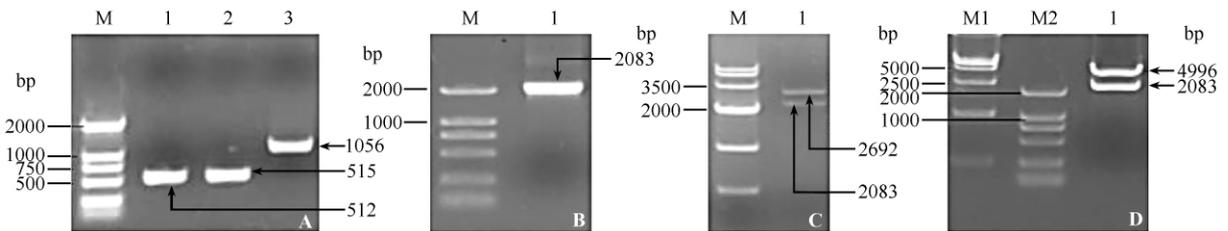


图 3. 基因敲除载体 pSET4s::VirD4 的构建和鉴定

Figure 3. Construction of gene knock-out vector pSET4s::VirD4. A: M, DL-2000 DNA Marker; lane 1-3: PCR products with VirD4 KOP 1/2, PCR products with KOP 5/6, Cm gene cassette. B: M, DL-2000 DNA Marker; lane 1: Products of overlap extension PCR. C: M, DL-5000 DNA Marker; lane 1: VirD4-pMD18T digested by EcoR I and BamH I. D: M1, DL-5000 DNA Marker; M2: DL-2000 DNA Marker; lane 2: pSET4s::VirD4 digested by EcoR I and BamH I.

2.3 基因敲除突变体的鉴定

提取突变株 Δ VirD4-89K 基因组作模板, 分别设计 5 对引物 MRP F/R, CM F/R, SPCF/R, VirD4 KOP 3/4, VirD4 KOP 1/6 进行 PCR 鉴定, 结果如图 4 所示, MRP 为猪链球菌特有基因, 确定菌株未被污染, SPC 证明突变株是双交换而非单交换, CM 说明 Cm 基因替换基因 VirD4 成功, VirD4 KOP 3/4 扩增不出基因 VirD4 的 520 bp 目的片段, VirD4 KOP 1/6 扩增

出 2083 bp 片段, 而基因 VirD4 本身全长 714 bp, 同时对 Δ VirD4 基因组进行基因测序, 结果显示基因 VirD4 完全被 Cm 基因所替代, 证明突变体构建成功。

2.4 突变体生物活性的分析

将野生株 05ZYH33 与突变株 Δ VirD4 涂布于血平板, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 培养箱内培养 18 h 后观察菌落特征, 发现两者无论是菌落形态还是溶血环大小无明显区别。突变株 Δ VirD4 和野生株 05ZYH33 的生

长曲线如图 5 所示,可见二者生长速度较为一致。

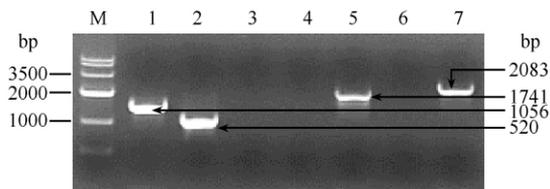


图 4. 基因敲除突变株 Δ VirD4 的 PCR 验证

Figure 4. PCR identification of knock-out mutant Δ VirD4. M: DL-5000 DNA Marker; lane 1 - 5: PCR products with MRP F/R, CM F/R, SPC F/R, VirD4 KOP 3/4, VirD4 KOP 1/6 using Δ VirD4 genomic DNA; lane 6: Negative control; lane 7: Positive control.

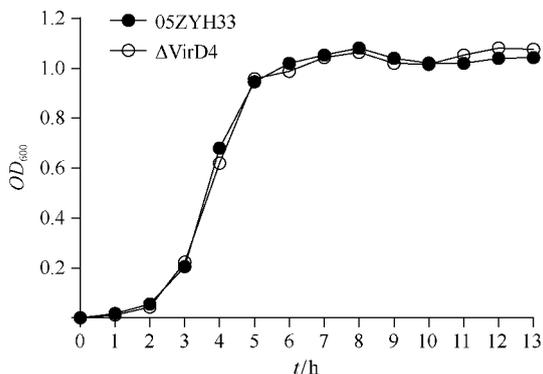


图 5. 突变株与野生株的生长曲线比较

Figure 5. The growth curve of mutant strain against wild strain.

2.5 全血杀伤实验

将野生株 05ZYH33 和突变株 Δ VirD4 分别与人的全血孵育 1 h 后, 稀释计数并计算杀菌率, 结果图 6 所示。与野生株 05ZYH33 的杀菌率 32.97% 相比, 突变株 Δ VirD4 的为 60.75% (3 份人全血的均值), 两者差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明 Δ VirD4 在人的全血中抵御血液中天然免疫细胞主要是多形核白细胞 (Polymorphonuclear Leukocytes, PMN) 的吞噬和杀菌能力有所减弱。

2.6 CD1 小鼠竞争感染及攻毒实验

对 6 只 CD1 小鼠进行竞争感染实验, 小鼠腹腔注射前的野生株 05ZYH33 和突变株 Δ VirD4 的 OD_{600} 值分别为 1.062 和 1.106, 菌落计数分别为 2.35×10^9 CFU/mL、 2.46×10^9 CFU/mL (两块 THB 板的均值)。注射后 6 h 眼球取血涂平板, 菌落计数, 计算竞争感染指数, 结果为 0.6976 ± 0.0936 , CI 值小于 1.0, 如图 7-A 所示。CD1 小鼠攻毒实验中, 小鼠腹腔注射前的野生株 05ZYH33 和突变株

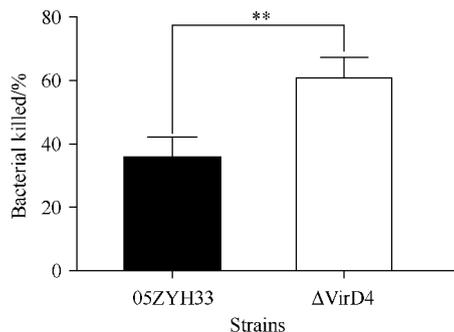


图 6. 全血对野生株和突变株的杀菌能力比较 (**: $P < 0.01$)

Figure 6. The capacity of whole blood killing of wild strain against mutant strain (**: $P < 0.01$).

Δ VirD4 的菌落计数分别为 2.38×10^9 CFU/mL、 2.51×10^9 CFU/mL (两块 THB 板的均值)。3 h 后 05ZYH33 组和 Δ VirD4 组部分小鼠出现精神萎靡、体态不稳、不进食的症状, 7 h 后发病小鼠开始出现死亡, 12 h 后 05ZYH33 组 CD1 小鼠全部死亡, 观察截止到 60 h, 此时 Δ VirD4 组 CD1 小鼠 50% 死亡, 而对照 PBS 组全部存活, 结果如图 7-B 所示。可以看出突变株相对于野生株来说, 在小鼠体内增殖更易被抑制和清除, 提示 VirD4 可能与其毒力相关。

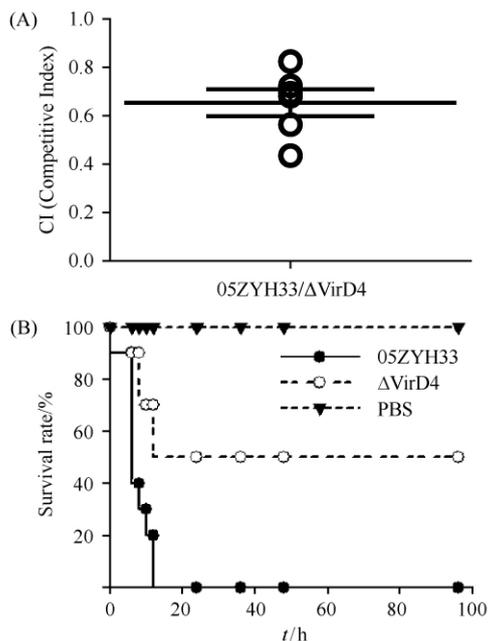


图 7. CD1 小鼠突变株与野生株竞争感染指数 (A) 和存活曲线 (B)

Figure 7. The competitive index (A) and survival curve of CD1 (B) of wild type strain against mutant strain with CD1 mice.

3 讨论

通过生物信息学比对,05ZYH33 株 T4SS 位于 89 K PAI 的 5 端,其中与致癌农杆菌 IV 分泌系统 VirB/VirD 复合体毒力基因有 4 个同源基因^[10]。细菌的 T4SS 可以输送一些生物活性效应物,通过细菌和真核细胞的细胞膜,作用于靶细胞,从而发挥其致病性^[11]。有研究发现,在一些革兰氏阴性菌, T4SS 参与先天免疫的调节和机体细胞因子的释放^[12]。例如,在 小鼠体内,布鲁氏菌 T4SS 可通过两种方式参与先天免疫,一是直接引起细菌效应分子的释放,从而被天然免疫系统感知;二是可使含有布鲁氏菌的吞噬体与巨噬细胞的内质网相互作用并发生融合,避免与溶酶体的融合,从而使布鲁氏菌逃避巨噬细胞的天然杀伤^[13]。

研究发现,在 BALB/C 小鼠的动物感染实验中,敲除了 IV 型分泌系统两个关键基因 (VirD4 或 VirB4) 的猪链球菌 2 型突变株,不但小鼠的感染致死率明显降低,而且其引发小鼠免疫应答的能力也大为减弱^[10]。在本研究中,我们采用 CD1 小鼠和仔猪作为毒力筛选的动物模型。虽然有研究认为同一菌株在猪和小鼠体内可表现出不同的毒力反应,如 S735 在猪中表现为温和毒力,在小鼠体内却表现为强毒力^[14]。但 Quessy 等的研究认为 CD1 小鼠和猪对致病性猪链球菌 2 型都表现出较高的敏感性,而且不同的分离株在猪和小鼠模型中表现出的毒力强弱状况也较为一致^[15]。

我们对猪链球菌 2 型 VirD4 基因采用同源重组的方法进行了敲除,并通过人全血杀伤模型、CD1 小鼠竞争感染实验和攻毒试验、仔猪竞争感染实验比较了突变株 Δ VirD4 和野生株的毒力变化。de Greeff 等研究者首次通过竞争性感染仔猪实验比较猪链球菌纤维蛋白结合蛋白突变株与野生株的毒力变化,之后这种实验方法在此类研究中被广泛采用^[16]。采用这种竞争混合感染的方法不但可以减少实验动物的使用量,而且还能降低动物间个体差异对数据的影响。在 CD1 小鼠竞争感染实验中 CI 值均小于 1.0,说明突变株 Δ VirD4 在 CD1 小鼠体内较野生株 05ZYH33 而言增殖受到了抑制。CD1 小鼠的攻毒试验,18 h 后野生株全部死亡,而 Δ VirD4 观察 100 h,死亡 50%,也说明 VirD4 可能为 05ZYH33 株的一个新的重要毒力因子。同时全血

杀伤结果也表明,突变株 Δ VirD4 在人全血中抵御血液中天然免疫细胞 PMN 的吞噬和杀菌能力较野生株有明显的减弱,更容易被宿主所清除。从以上结果表明猪链球菌 2 型 IV 型分泌系统组分 VirD4 与其毒力相关,为 05ZYH33 株的一个新的重要毒力因子,并在早期抵抗天然免疫细胞杀伤中发挥一定作用,但其如何逃避宿主天然免疫防御引发严重感染的具体作用机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] Feng Y, Zhang H, Ma Y, Gao GF. Uncovering newly emerging variants of *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent. *Trends in Microbiology*, 2010, 18 (3): 124-131.
- [2] Tang J, Wang C, Feng Y, Yang W, Song H, Chen Z, Yu H, Pan X, Zhou X, Wang H, Wu B, Wang H, Zhao H, Lin Y, Yue J, Wu Z, He X, Gao F, Khan AH, Wang J, Zhao GP, Wang Y, Wang X, Chen Z, Gao GF. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Medicine*, 2006, 3: e151.
- [3] Vecht U, Wisselink HJ, van Dijk JE, Smith HE. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infection and Immunity*, 1992, 60(2): 550-556.
- [4] Martinez G, Pestana de Castro AF, Ribeiro Pagnani KJ, Nakazato G, Dias da Silveira W, Gottschalk M. Clonal distribution of an atypical MRP⁺, EF⁺, and suilysin⁺ phenotype of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains in Brazil. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2003, 67(1): 52-55.
- [5] Lecours MP, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Sequra M. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *The Journal of Infectious Disease*, 2011, 204(6): 919-929.
- [6] Chabot-Roy G, Willson P, Segura M, Lacouture S, Gottschalk M. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microbial Pathogenesis*, 2006, 41(1): 21-32.
- [7] Pian Y, Gan S, Wang S, Guo J, Wang P, Zheng Y, Cai X, Jiang Y, Yuan Y. Fhb, a novel factor H-binding surface protein, contributes to the antiphagocytic ability and virulence of *Streptococcus suis*. *Infection and Immunity*, 2012, 80 (7): 2402-2413.
- [8] Liu P, Pian Y, Li X, Xie W, Zhang C, Zheng Y, Jiang Y, Yuan Y. *Streptococcus suis* Adenosine synthase functions as an effector in evasion of PMN-mediated innate immunity. *The Journal of Infectious Disease*, 2014, 210 (1): 35-45.

- [9] 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, Feng T, Guo Z, Ju A, Ge J, Dong Y, Sun W, Jiang Y, Wang J, Yan J, Yang H, Wang X, Gao GF, Yang R, Wang J, Yu J. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS One*, 2007, 2(3): e315.
- [10] Zhao Y, Liu G, Li S, Wang M, 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(2): 274-81.
- [11] 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: 451-85.
- [12] Takamatsu R, Teruya H, Takeshima E, Ishikawa C, Matsumoto K, Mukaida N, Li JD, Heuner K, Higa F, Fujita J, Mori N. Molecular characterization of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression in T cells. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 1.
- [13] Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of Experimental Medicine*, 2003, 198(4): 545-56.
- [14] Christie PJ. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(10): 3085-94.
- [15] Quessy S, Dubreuil JD, Caya M, Higgins R. Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins. *Infection and Immunity*, 1995, 63(5): 1975-1979.
- [16] de Greeff A, Buys H, Verhaar R, Dijkstra J, van Alphen L, Smith HE. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and Immunity*, 2002, 70(3): 1319-25.

Correlation between Type IV secretion system component VirD4 and virulence for *Streptococcus suis* 2

Junping Wang^{1#}, Yuling Zheng^{1#}, Yaya Pian¹, Jie Guo², Huaijie Hao², Yongqiang Jiang^{1*}

¹ State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

² Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] In order to study the role of SS2 Type IV Secretion System VirD4 in evasion of the host innate immune killing, we constructed a knockout mutant Δ VirD4. Then we studied its biological activity and virulence.

[Methods] The two VirD4 flanking DNA sequences were amplified using genome of 05ZYH33 as template. We also amplified the Cm sequence of shuttle vector pSET1, and through overlap extension PCR we connected the three fragments together. Using suicide vector pSET4s, we constructed the recombinant gene knockout vector pSET4s::VirD4. The mutant Δ VirD4 was successfully constructed by allelic replacement. Virulence of mutant strain was compared with wild type strain 05ZYH33 through *in vitro* bactericidal assays, competitive infection and challenge experiment of CD1 mice.

[Results] Mutant strain Δ VirD4 was constructed successfully, its virulence attenuated compared to the wild type strain.

[Conclusion] These findings indicated that Type IV Secretion System component VirD4 contributed to the virulence of *S. suis* with important functions in evading innate immunocyte killing.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2, pathogenicity island 89K, Type IV Secretion System, virulence

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81371766, 81171528, 81401642)

* Corresponding author. Tel: +86-40-66948487; E-mail: jiangyq@nic.bmi.ac.cn

These authors contributed equally to this work.

Received: 3 August 2014/Revised: 24 October 2014