



## DNA 核酸酶与猪链球菌 9 型毒力的关系

唐欢宇<sup>1,2,3</sup>, 任海燕<sup>1,2,3</sup>, 吴宗福<sup>1,2,3\*</sup>, 陆承平<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

<sup>2</sup>农业部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095

<sup>3</sup>世界动物卫生组织猪链球菌病参考实验室, 江苏 南京 210095

**摘要:**【目的】除了猪链球菌 2 型外, 猪链球菌 9 型(SS9)也是目前流行血清型, 同时也是人畜共患病原菌。前期研究发现, DNA 核酸酶(SsnA)存在于 SS9 毒力株中, 在 SS9 无毒株中不存在。为明确 SsnA 对 SS9 毒力的影响, 本研究构建 *ssnA* 缺失株  $\Delta ssnA$ , 并研究其生物学功能。【方法】用穿梭质粒 pSET-4s 构建  $\Delta ssnA$ , 并通过斑马鱼毒力试验、HEp-2 细胞黏附、猪全血存活和酶活检测等试验, 评价 SsnA 对 SS9 毒力的影响。【结果】斑马鱼毒力试验显示,  $\Delta ssnA$  对斑马鱼毒力显著降低, 半数致死量是野生株的 11.2 倍;  $\Delta ssnA$  对 HEp-2 细胞的黏附率为野生株的 60.61%;  $\Delta ssnA$  在猪全血中的存活率为野生株的 71.88%; 酶活试验表明, SsnA 可降解线性和环状 DNA。【结论】本研究表明 SS9 SsnA 具有降解线性和环状 DNA 能力, 该基因缺失后细菌对斑马鱼毒力、黏附 HEp-2 细胞能力、在猪全血中存活及分解 DNA 能力都显著降低, 证实 SsnA 是 SS9 的一个毒力因子。

**关键词:** 猪链球菌 9 型, DNA 核酸酶, 毒力因子

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种重要的人畜共患病原菌, 可导致猪的脑膜炎、心内膜炎、关节炎、败血症等多种疾病<sup>[1]</sup>。根据荚膜多糖抗原性的不同, 猪链球菌可分为 33 个血清型和部分未定型菌株, 其中猪链球菌 2 型(SS2)流行最广, 对人和猪的致病力最强<sup>[1]</sup>。除了 SS2 以外, 猪链球菌 9 型(SS9)也是一个流行血清型, 在中国、澳大利亚、荷兰、比利时和德国等国家分离率较高<sup>[2-5]</sup>。

最新研究表明, SS9 也可感染人致病<sup>[6]</sup>。目前, 对猪链球菌毒力因子的研究主要集中在 SS2, 对 SS9 毒力因子的研究相对较少。

在革兰氏阳性致病菌金黄色葡萄球菌和化脓链球菌中, DNA 核酸酶(SsnA)是重要的毒力因子。金黄色葡萄球菌 DNA 核酸酶通过降解中性粒细胞胞外陷阱(Neutrophil extracellular traps, NETs)中的 DNA, 从而抵抗中性粒细胞清除<sup>[7]</sup>。化脓链

基金项目: 留学回国人员科研启动基金(第 46 批, 南京农业大学, 吴宗福); 国家自然科学基金面上项目(31572544); 公益性行业(农业)科研专项“猪链球菌病防控技术与示范”(201303041); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-25-84398606; E-mail: wuzongfu@njau.edu.cn

收稿日期: 2016-06-02; 修回日期: 2016-12-06; 网络出版日期: 2016-12-23

球菌 DNA 核酸酶不仅可以降解 NETs 的 DNA 抵抗中性粒细胞清除<sup>[8]</sup>, 还可以抑制 TLR9 介导的天然免疫防御和吞噬细胞的杀菌能力<sup>[9]</sup>。本课题组前期比较蛋白组学发现猪链球菌 SsnA 存在于 SS9 毒力株 GZ0565 中, 而在 SS9 无毒株中不存在, 提示 SsnA 可能是 SS9 的毒力因子<sup>[5]</sup>。为明确 SsnA 对 SS9 毒力的影响, 本研究构建 SS9 毒力株 GZ0565 *ssnA* 无痕缺失株, 并比较野生株与缺失株在对斑马鱼毒力、HEp-2 细胞黏附、猪全血存活及 DNA 核酸酶活性等方面的差异, 从而为更好阐明 SsnA 功能、了解 SS9 致病机制和防控该类疫病提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和培养条件:** 猪链球菌 9 型 GZ0565 株于 2005 年在中国广州分离自患脑膜炎病猪<sup>[3, 5]</sup>。本研究用到的 DH5 $\alpha$  和 BL21 (DE3) 感受态购自南京诺唯赞生物科技有限公司。构建缺失株所用的质粒 pSET-4s 由日本动物健康国家研究所 Daisuke Takamatsu 博士馈赠, 质粒详细信息及图谱详见参考文献<sup>[10]</sup>。HEp-2 细胞(ATCC CCL23)

购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。除特殊标注外, 所有的猪链球菌均在 37 °C 条件下, 培养于 THB 液体或平板; 大肠杆菌在 37 °C 条件下培养于 LB 液体或平板。壮观霉素在需要条件下添加, 培养猪链球菌时, 壮观霉素终浓度为 100  $\mu$ g/mL, 培养大肠杆菌时, 壮观霉素终浓度为 50  $\mu$ g/mL, 氨苄青霉素终浓度为 100  $\mu$ g/mL。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** THB 购自美国 BD 公司; 限制性内切酶、Premix、T4 连接酶、片段回收试剂盒购自 TaKaRa 生物工程公司; 提质粒试剂盒、胶回收试剂盒以及提基因组试剂盒购自 Omega 公司; 绵羊血、抗生素购自北京鼎国生物技术有限公司; RPMI-1640 细胞培养液、胰酶等细胞培养相关试剂购自 Hyclone 公司; THY 培养基为添加了 5% 酵母浸出物的 THB。凝胶成像、紫外分光光度计、电击杯、电穿孔仪购自 Bio-Rad 公司。

### 1.2 *ssnA* 缺失质粒的构建

以 GZ0565 基因组 DNA 为模板, 用引物 *ssnA*-A、*ssnA*-B 和 *ssnA*-C、*ssnA*-D (表 1), 分别扩增 *ssnA* 基因的上、下游同源臂 *ssnA*-AB 和 *ssnA*-CD 片段; 以胶回收的 PCR 产物为模板, *ssnA*-A、*ssnA*-D

表 1. 本研究用到的引物  
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3') <sup>a</sup>	Restriction sites	Sizes/bp
<i>ssnA</i> -A	ATATGCA <u>AAGCTTT</u> CAACCCTGCCATGTACCTGCAC	<i>Hind</i> III	1015
<i>ssnA</i> -B	ATGGAAGAGAGAACGGTTTCTAA		
<i>ssnA</i> -C	TTAGAAACCGTTCTCTCTTCCATTGCCTTGTCAAAAAACAAAA		1010
<i>ssnA</i> -D	ATATGCGA <u>ATTC</u> TTCCACATCACCAATCATGAA	<i>Eco</i> R I	
<i>ssnA</i> -X	ACCAGATGGACGAGTCCTACAA		2274
<i>ssnA</i> -Y	CATTTCCATAACGACCAGACCT		
<i>ssnA</i> -F	TCTTGTCACTATCGCAGGACG		464
<i>ssnA</i> -R	CTGGTCCAGCGATACGACCGGTG		
<i>rssnA</i> -up	GAGTCAGGATCCACAACAACCATTATCCCAAATGATGA	<i>Bam</i> H I	1266
<i>rssnA</i> -down	ATACAGGAGCTCTTAGGATTCTTTTTGTTTTTGGACAAGGCAGGTG	<i>Sac</i> I	

<sup>a</sup>Underlined sequences are introduced restriction sites.

为引物进行融合 PCR, 扩增 *ssnA*-AD 片段; 将胶回收的 *ssnA*-AD 片段与提取的 pSET-4s 质粒用 *Hind* III 和 *Eco*R I 于 37 °C 进行双酶切; 酶切片段经片段与质粒连接后转化 DH5 $\alpha$  感受态, 次日挑单菌落进行菌液 PCR 鉴定; 阳性菌落进一步提质粒进行双酶切鉴定, 同时送上海桑尼进行测序; 测序正确质粒 pSET4s-*ssnA* 电转 GZ0565 感受态, 以构建 *ssnA* 基因缺失菌株; 感受态的制备参照 Takamatsu 等报道的方法<sup>[11]</sup>。

### 1.3 无痕缺失株的筛选

缺失株的筛选参照 Takamatsu 等<sup>[11]</sup>方法: 将电转阳性菌落划壮观霉素抗性 THB 平板, 28 °C 培养过夜; 挑单菌落, 37 °C, 加壮观霉素条件下静置培养于 THB 培养基至浑浊, 划壮观霉素抗性平板; 挑单菌落, 37 °C, 180 r/min, 加壮观霉素 THB 液体传 3 代; 划 THB 壮观霉素抗性平板, 37 °C 培养过夜; 挑单菌落于 THB 液体, 28 °C, 180 r/min, 不添加抗生素条件下培养于 THB 液体, 传 5–10 代; 传至第 5 代, 取 1 mL 细菌, 10 倍比稀释至 10<sup>3</sup>, 取 100  $\mu$ L 细菌稀释液分别涂壮观霉素抗性平板和无抗性平板; 观察 2 个平板菌落数是否有显著差异, 若差异显著, 则表明有可能发生同源重组; 将无抗性平板上的菌落划线有壮观霉素抗性和无壮观霉素抗性的 THB 平板, 28 °C 培养 24 h; 挑取在无抗性平板上生长, 在壮观霉素抗性平板上不生长的菌株用引物 *ssnA*-X、*ssnA*-Y 和引物 *ssnA*-F、*ssnA*-R 同时进行菌液 PCR 鉴定筛选; 最后用引物 *ssnA*-X、*ssnA*-Y 进行 PCR 测序。

### 1.4 截短 SsnA (rSsnA) 的表达纯化及兔抗血清的制备

以 GZ0565 基因组为模板, 用引物 *rssnA*-up 和 *rssnA*-down 扩增截短的 *ssnA* 基因片段; PCR

反应产物经 DNA 回收试剂盒回收后, 与表达载体 pET-32a 连接, 转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞, 获得重组表达质粒 pET-32a-*rssnA*; 将含有 pET-32a-*rssnA* 质粒的 BL21 (DE3) 菌液以 1 : 100 的比例接种于含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素抗性的 LB 培养基中, 37 °C 摇床 180 r/min 培养至  $OD_{600}=0.4$  时, 加入异丙基- $\beta$ -D-半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.1 mmol/L 继续 37 °C 摇床 180 r/min 培养 4 h 后, 经 PBS (pH 7.4) 洗 2 遍, 用上清溶解缓冲液(磷酸钠 20 mmol/L、氯化钠 500 mmol/L、咪唑 30 mmol/L) 重悬菌体; 菌体超声波裂解(250 W, 5 s, 间隔 10 s, 总共 30 min)后 4 °C、12000 r/min 离心 5 min, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达情况。

使用 GE Healthcare 公司的 HisTrap Purification Kit 纯化 rSsnA 融合蛋白, 具体方法参照说明书。将纯化后 rSsnA 背部皮下多点注射免疫新西兰大白兔, 0.5 mL 纯化的重组蛋白 rSsnA (200  $\mu$ g) 混合 0.5 mL 弗氏完全佐剂首次免疫, 14 d 后用 0.5 mL 纯化的重组蛋白 *rssnA* (200  $\mu$ g) 混合 0.5 mL 弗氏不完全佐剂二次免疫, 28 d 后用 0.5 mL 纯化的重组蛋白 *rssnA* (200  $\mu$ g) 混合 0.5 mL 弗氏不完全佐剂三次免疫。首次免疫前耳缘静脉采血作为阴性血清, 三免后 14 d 心脏采血, ELISA 测定抗体效价。

### 1.5 Western blot 检测 SsnA

Western blot 方法参照我们前期发表的文章<sup>[12]</sup>; 取 1 mL 培养至  $OD_{600}=1$  的野生株和  $\Delta$ *ssnA* 的菌液, 13000 r/min 离心 2 min, 用 SDS-PAGE 上样缓冲液稀释至 0.01  $OD/\mu$ L, 100 °C 水浴 10 min 使蛋白变性; 取 10  $\mu$ L 蛋白样品经 12% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜(GE Healthcare), 用含 5% 脱脂奶的 TBST (含 0.05% Tween 20 的 PBS) 37 °C

封闭 2 h; 根据 Tanon TM High-sig ECL Western Blotting 化学发光试剂盒(上海天能)说明, 以免抗 rSsnA 血清为一抗(1:1000 稀释), HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(北京鼎国, 1:5000 稀释)作为二抗, 使用 Tanon 5100 化学发光仪(上海天能)捕捉信号。

### 1.6 斑马鱼毒力试验

斑马鱼毒力试验参照我们前期发表的文章<sup>[5, 13-14]</sup>。AB 纯系斑马鱼, 饲养 1 w 确认健康之后进行毒力试验。野生株 GZ0565、缺失株  $\Delta$ ssnA 分别在 THB 血平板上复苏, 复苏菌株经斑马鱼复壮后进行攻毒。挑经斑马鱼复壮单菌落过夜培养, 第 2 天早上 1:100 转接 THB 液体, 37 °C, 180 r/min, 培养至  $OD_{600}=0.6$ ; 各取适量菌液, 8000 r/min, 5 min, 4 °C, 经 PBS 洗 2 次后, 用 PBS 重悬细菌, 并用 PBS 将细菌分别稀释至  $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  和  $10^7$  活菌数/mL, 用于攻毒试验; 取一部分细菌进行倍比稀释, 涂 THB 平板进行计数, 以确认斑马鱼体内实际注射的细菌数。斑马鱼随机分成 9 组, 15 只/组, 其中 8 组分别经腹腔注射野生株和缺失株不同稀释度细菌悬液, 另外一组注射 PBS 做空白对照; 斑马鱼在注射前用 90 mg/L 甲磺酸三卡因(MS-222)进行麻醉; 细菌接种后于 28 °C 温箱培养, 连续观察 1 w 记录斑马鱼死亡情况, 按 Reed-Muench 法计算半数致死量  $LD_{50}$ 。

### 1.7 HEp-2 细胞黏附试验

野生株 GZ0565、缺失株  $\Delta$ ssnA 分别在 THB 血平板复苏, 复苏菌株经斑马鱼复壮后进行该试验, 参照我们前期发表的文章<sup>[15]</sup>; 挑单菌落过夜培养, 第 2 天早上 1:100 转接 THB 液体, 37 °C, 180 r/min, 培养至  $OD_{600}=0.6$ ; 取 1 mL 细菌, 8000 r/min, 5 min, 4 °C, PBS 洗 2 次; 用不含血清的 RPMI-1640 细胞培养基将细菌调整至  $5 \times 10^7$

活菌数/mL; 取一部分细菌悬液进行倍比稀释, 涂 THB 固体平板, 以确认加入细胞中的实际细菌数; HEp-2 细胞稳定培养 1 w 后, 试验前一天晚上铺 24 孔板, 每个细胞孔中加入约  $1 \times 10^6$  个细胞, 37 °C, 5%  $CO_2$  培养过夜, 至细胞长满 70%–80%; 细胞用不含血清的 RPMI-1640 洗 2 次, 5 min/次; 加入 1 mL 不含血清的 RPMI-1640 细菌悬液, 每株菌做 3 个重复, 800×g, 25 °C 离心 15 min, 37 °C 孵育 2 h; 细胞板用 1 mL PBS 洗 5 次, 5 min/次; PBS 弃去, 加入 100  $\mu$ L 胰酶, 37 °C, 作用 10 min; 待细胞消化下来, 加入 900  $\mu$ L 无菌的 ddH<sub>2</sub>O 迅速吹打终止胰酶消化; 取 100  $\mu$ L 进行倍比稀释, 涂 THB 平板, 37 °C, 24 h, 计数。同时设不加细胞的阴性对照, 比较野生株与缺失株黏附在细胞板的数量。试验重复 3 次, 用非配对 *t* 检验做统计学分析。

### 1.8 猪全血存活试验

猪全血存活试验参照我们前期发表的文章, 采集经 ELISA 检测猪链球菌抗体为阴性的健康猪血液<sup>[14]</sup>。野生株 GZ0565、缺失株  $\Delta$ ssnA 经血平板复苏后, 挑单菌落过夜培养, 第 2 天早上 1:100 转接 THB 液体, 37 °C, 180 r/min, 培养至  $OD_{600}=0.6$ ; 取 1 mL 细菌, 8000 r/min, 5 min, 4 °C, PBS 洗 1 次; 用适量 PBS 重悬细菌, 使细菌量达到  $5 \times 10^6$  活菌数/mL; 取一部分菌液进行倍比稀释, 以确认加入血液中的细菌数; 另取 200  $\mu$ L 细菌悬液与 2 mL 新鲜血液混匀, 37 °C, 每隔 15 min 上下颠倒混匀, 1 h 后取 100  $\mu$ L 全血培养物进行倍比稀释, 涂 THB 平板计数, 以确认细菌在猪血中的存活率, 试验重复 3 次, 用非配对 *t* 检验做统计学分析。

### 1.9 DNA 核酸酶活性检测

DNA 核酸酶活性检测参照 Nicole de Buhr 等

的方法<sup>[16]</sup>。野生株 GZ0565、缺失株  $\Delta ssnA$  经 THB 血平板复苏；挑单菌落过夜培养，第 2 天 1:100 转接，37 °C，180 r/min，培养至  $OD_{600}=0.6$ ；取 1.5 mL，8000 r/min，4 °C，5 min，THB 洗 2 次，最后用适量体积液体将细菌重悬，细菌浓度控制在  $OD_{600}=1.8$ 。在比较菌株 GZ0565 和缺失株  $\Delta ssnA$  对 DNA 降解程度的试验中，20  $\mu$ L THB 细菌悬液添加 40  $\mu$ L SsnA 缓冲液 1 (300 mmol/L Tris-HCl pH 7.5，3 mmol/L  $CaCl_2$ ，3 mmol/L  $MgCl_2$ ) 和适量 DNA ( $\lambda$ DNA 的终浓度为 40 ng/ $\mu$ L，细菌基因组 DNA 的终浓度为 32.5 ng/ $\mu$ L)，用 THB 将终体积补至 100  $\mu$ L，于 37 °C 作用 24 h；DNA 降解程度通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳确定。

为了探讨 DNA 核酸酶在细菌降解宿主 DNA 产生脱氧腺苷中的作用，比较了野生株 GZ0565 和  $\Delta ssnA$  降解  $\lambda$ DNA 产生磷酸根的含量；细菌的处理与 DNA 核酸酶活性检测相同，用 20  $\mu$ L SsnA 缓冲液 2 (100 mmol/L Tris-HCl pH 7.5，1 mmol/L  $CaCl_2$ ，1 mmol/L  $MgCl_2$ ) 重悬细菌后添加 40  $\mu$ L SsnA 缓冲液 1 和 4  $\mu$ g  $\lambda$  DNA，用 SsnA 缓冲液 2 将

终体积补至 100  $\mu$ L，于 37 °C 作用 24 h。细菌降解 DNA 产生磷酸根的含量通过试剂盒 Quanti-Chrom Phosphate Assay Kit (BioAssay Systems) 进行检测，具体的操作参照说明书进行；以上反应液，10000 r/min，离心 5 min；取上清，用试剂盒中的空白对照液体稀释至合适的浓度；取 50  $\mu$ L 加入 96 孔板，另取 50  $\mu$ L 阳性对照液和空白对照液加入 96 孔板；各反应孔中加入 100  $\mu$ L 反应液，轻轻混匀，室温作用 30 min；用酶标仪检测  $OD_{620}$ ，(1 mg/dL 磷酸根等于 105.3  $\mu$ mol/L) 根据说明书公式计算产生的磷酸根的含量，数据用非配对 *t* 检验做统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 *ssnA* 缺失菌株的构建和鉴定

用引物 *ssnA*-A、*ssnA*-B 和 *ssnA*-C、*ssnA*-D，分别扩增 *ssnA* 基因的上、下游同源臂 AB 和 CD 片段，经 PCR 融合后，与 pSET-4s 质粒相连。缺失质粒经 PCR 和酶切鉴定，融合片段大小 2025 bp，表明成功构建缺失质粒 pSET4s-*ssnA* (图 1-A, B)。

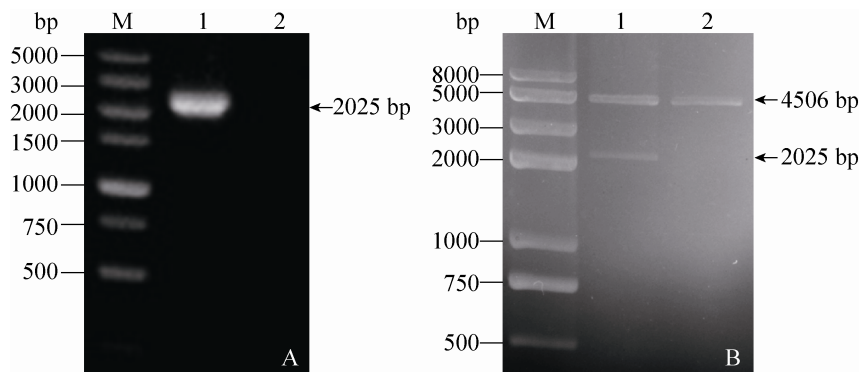


图 1. pSET4s-*ssnA* PCR 以及酶切鉴定

Figure 1. PCR and restriction endonuclease confirmation of pSET4s-*ssnA*. A: PCR confirmation of pSET4s-*ssnA*. Lane 1: primers *ssnA*-A/*ssnA*-D, pSET4s-*ssnA* as template; lane 2: primers *ssnA*-A/*ssnA*-D, pSET4s as negative control; M: DNA marker DL5000. B: Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pSET4s-*ssnA*. Lane 1: pSET4s-*ssnA* digested by *Hind* III and *Eco*R I; lane 2: pSET4s digested by *Hind* III and *Eco*R I as negative control; M: DNA marker DL5000.

按照无痕缺失方法,将缺失质粒 pSET4s-*ssnA* 电转化 GZ0565 感受态细胞,挑选无痕缺失株。用引物 *ssnA*-F/*ssnA*-R 扩增 *ssnA* 基因内部片段,野生株 GZ0565 中可扩增出 464 bp 的片段,从缺失株中则不能扩增出该片段;用引物 *ssnA*-X/*ssnA*-Y 区分野生株和缺失株,在野生株 GZ0565 中能扩增出 5334 bp 的片段,从缺失株则扩增出 2274 bp 的片段(图 2)。上述结果表明,*ssnA* 缺失株  $\Delta$ *ssnA* 成功构建。

### 2.2 rSsnA 的表达及 Western blot 检测 SsnA

含有重组质粒 pET-32a-r*ssnA* 的 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后 4 h,样品处理后经 SDS-PAGE 电泳,如图 3 所示,菌体表达了分子量为 64 kDa 左

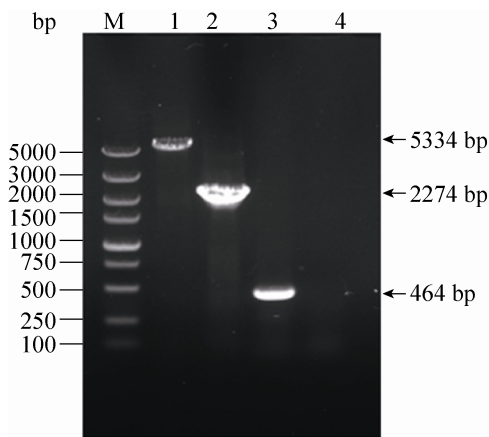


图 2.  $\Delta$ *ssnA* PCR 鉴定

Figure 2. PCR confirmation of the deletion mutant  $\Delta$ *ssnA*. Lane 1: primers *ssnA*-X/*ssnA*-Y, GZ0565; lane 2: primers *ssnA*-X/*ssnA*-Y,  $\Delta$ *ssnA*; lane 3: primers *ssnA*-F/*ssnA*-R, GZ0565; lane 4: primers *ssnA*-F/*ssnA*-R,  $\Delta$ *ssnA*; M: DNA marker DL5000.

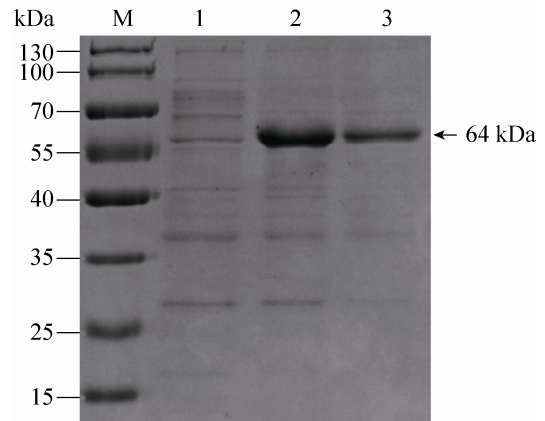


图 3. SDS-PAGE 检测 rSsnA 表达

Figure 3. The expression of rSsnA analyzed by SDS-PAGE. M: Protein molecular weight marker; Lane 1: BL21 (DE3) containing pET-32a-r*ssnA* without IPTG induction; lane 2: BL21 (DE3) containing pET-32a-r*ssnA* with IPTG induction for 4 h; lane 3: the supernatant of BL21 (DE3) after sonication that contains pET-32a-r*ssnA* with IPTG induction.

右的融合蛋白(rSsnA 分子量 45.4 kDa 加上 pET-32a 融合片段 18 kDa),且融合蛋白主要表达在超声裂解上清中。

将野生株 GZ0565 和  $\Delta$ *ssnA* 全菌蛋白经 SDS-PAGE 并转至 PVDF 膜后,分别以兔抗 rSsnA 血清和免疫前的阴性血清作为一抗进行 Western blot 检测。如图 4-A 所示,以兔抗 rSsnA 血清为一抗时,GZ0565 在 112 kDa 处有明显条带(SsnA 全长为 112 kDa),而  $\Delta$ *ssnA* 未见相应条带;如图 4B 所示,以免疫前的阴性血清作为一抗,GZ0565 和  $\Delta$ *ssnA* 均未见相应大小条带,证实缺失株不能表达 SsnA。

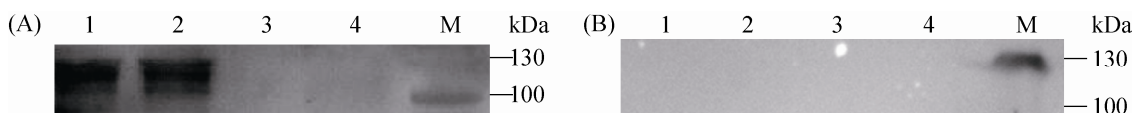


图 4. Western blot 检测 SsnA 蛋白

Figure 4. Western blot analysis of SsnA expression. A: M: protein molecular weight marker; lane 1-2: wild type strain GZ0565 was probed with rabbit anti-rSsnA serum; lane 3-4:  $\Delta$ *ssnA* was probed with rabbit anti-rSsnA serum; B: M: protein molecular weight marker; lane 1-2: wild type strain GZ0565 was probed with rabbit serum before immunization; lane 3-4:  $\Delta$ *ssnA* was probed with rabbit serum before immunization.

### 2.3 斑马鱼毒力试验

将野生株 GZ0565 和  $\Delta ssnA$  分别攻击斑马鱼, 计算其  $LD_{50}$ , 结果如表 2 所示, GZ0565 对斑马鱼的  $LD_{50}$  为  $1.75 \times 10^5$  活菌数/尾, 而  $\Delta ssnA$  对斑马鱼的  $LD_{50}$  为  $1.96 \times 10^6$  活菌数/尾, 缺失株的  $LD_{50}$  是野生株的 11.2 倍(表 2), 证实 *ssnA* 缺失后对斑马鱼毒力降低。

### 2.4 HEp-2 细胞黏附试验

HEp-2 细胞是评价猪链球菌黏附宿主细胞的较好体外模型<sup>[17]</sup>。为探究 SsnA 对 SS9 黏附宿主细胞能力的影响, 比较了野生株 GZ0565 和  $\Delta ssnA$  对 HEp-2 细胞的黏附能力。与野生株相比,  $\Delta ssnA$  对 HEp-2 细胞的黏附能力极显著下降( $P < 0.01$ ), 仅为野生株的 60.61% (图 5); 同时设不加细胞的阴性对照, 野生株与缺失株黏附在细胞板的数量活菌数无显著差异。

### 2.5 猪全血存活试验

要引起宿主致病, 猪链球菌首先必须要能在血液中存活<sup>[18]</sup>。为探讨 SsnA 对 SS9 在猪血液中的存活能力的影响, 比较了野生株 GZ0565 和  $\Delta ssnA$  在猪全血中的存活。如图 6 所示, *ssnA* 缺

表 2. 斑马鱼毒力试验中 GZ0565 和  $\Delta ssnA$   $LD_{50}$  测定结果

Table 2.  $LD_{50}$  of GZ0565 and  $\Delta ssnA$  in zebrafish model

Dose of infection (CFU)		Mortality of mice	
GZ0565	$\Delta ssnA$	GZ0565	$\Delta ssnA$
$1.12 \times 10^8$	$7.00 \times 10^7$	14/15	14/15
$1.12 \times 10^7$	$7.00 \times 10^6$	14/15	12/15
$1.12 \times 10^6$	$7.00 \times 10^5$	11/15	4/15
$1.12 \times 10^5$	$7.00 \times 10^4$	3/15	1/14
$LD_{50}$		$1.75 \times 10^5$	$1.96 \times 10^6$

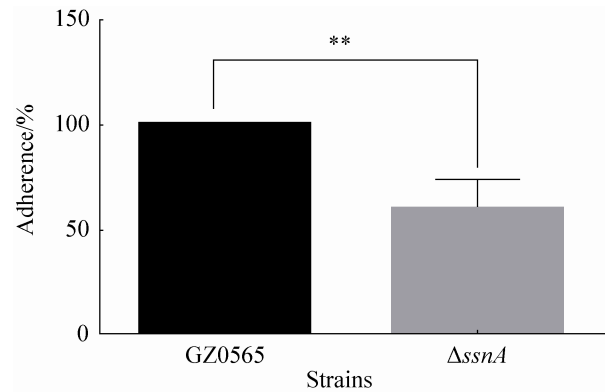


图 5. GZ0565 和  $\Delta ssnA$  对 HEp-2 细胞的黏附率

Figure 5. The adherence rate of wild type strain GZ0565 and  $\Delta ssnA$  to HEp-2 cells. The adherence rate of  $\Delta ssnA$  was only 60.61% ± 6.65% (Mean ± SD) of wild type level. \*\* $P < 0.01$ .

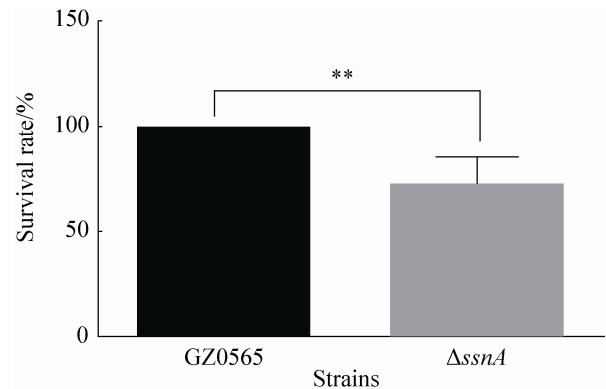


图 6. GZ0565 和  $\Delta ssnA$  在猪全血中的存活率

Figure 6. Survival rate of GZ0565 and  $\Delta ssnA$  in pig blood. The survival rate of  $\Delta ssnA$  in pig blood was only 71.88% ± 6.76% (Mean ± SD) of wild type level. \*\* $P < 0.01$ .

失后, 缺失株在血液中的存活能力极显著下降( $P < 0.01$ ), 仅为野生株的 71.88%。

### 2.6 DNA 酶活性的检测

为证实 SS9 SsnA 降解 DNA 活性, 分别以线性 DNA ( $\lambda$  DNA) 和环状 DNA (GZ0565 基因组 DNA)

为底物,比较野生株和  $\Delta ssnA$  降解 DNA 能力。如图 7 所示,与野生株 GZ0565 相比,  $\Delta ssnA$  降解 DNA 的能力明显降低。有研究表明,金黄色葡萄球菌 DNA 核酸酶降解宿主 DNA,进而核苷酸酶进一步降解产生脱氧腺苷和磷酸根,产生的脱氧腺苷介导巨噬细胞凋亡,促进细菌在体内增殖,可通过检测磷酸根的量判定产生脱氧腺苷的水平<sup>[19]</sup>。通过检测磷酸根的含量,比较野生株和  $\Delta ssnA$  降解 DNA 产生脱氧腺苷的水平。如表 3 所示,与野生株相比,  $\Delta ssnA$  降解 DNA 产生磷酸根含量极显著降低( $P < 0.0001$ ),提示产生更少的脱氧腺苷。

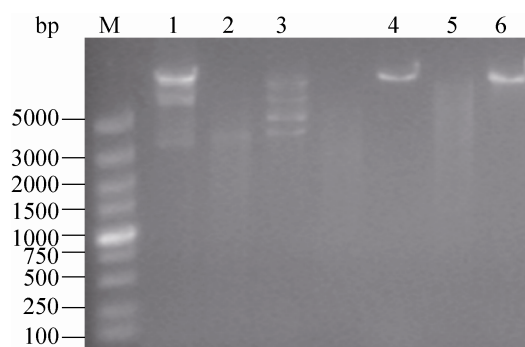


图 7. GZ0565 和  $\Delta ssnA$  降解 DNA 试验

Figure 7. Electrophoretic analysis of DNA degradation by strain GZ0565 and  $\Delta ssnA$ . Lane 1: Control GZ0565 genome DNA; lane 2: GZ0565 genome DNA+strain GZ0565; lane 3: GZ0565 genome DNA+strain  $\Delta ssnA$ ; lane 4: Control  $\lambda$  DNA; lane 5:  $\lambda$  DNA+strain GZ0565; lane 6:  $\lambda$  DNA+strain  $\Delta ssnA$ ; M: DNA Marker DL5000.

表 3. 细菌降解  $\lambda$  DNA 产生磷酸根的能力

Table 3. Ability of bacteria to produce Pi by degrading  $\lambda$  DNA

Strains	Average of total concentration of Pi ( $\mu\text{mol/L}$ )	Bacteria added (CFU/mL)	Ability of bacteria to produce Pi (nmol/min/ $10^8$ cells)
GZ0565	107.0	$1.31 \times 10^9$	0.272
$\Delta ssnA$	39.0	$8.05 \times 10^8$	0.161

### 3 讨论

Fontaine 等已经确定 SsnA 分泌于 SS2 上清中,证明从内在器官中分离的菌株与表达该酶具有正相关,但并未对其功能进行深入研究<sup>[20]</sup>。Nicole de Buhr 等通过体外实验(*in vitro*)证实 SS2 SsnA 能够有效降解中性粒细胞胞外陷阱(Neutrophil extracellular traps, NETs)<sup>[16]</sup>,但并未通过动物实验证实其对细菌毒力的影响。虽然 Haas 等通过转座子插入方法筛选 SS2 *ssnA* 突变株,突变株对阿米巴毒力降低<sup>[21]</sup>,但转座子存在多位点插入的可能,除了 *ssnA* 基因外,可能还存在其他基因的突变。

本研究通过无痕缺失方法,成功构建 *ssnA* 无痕缺失株。通过体内外等一系列实验,证实 SsnA 是 SS9 毒力因子,且 *ssnA* 缺失后细菌黏附 HEp-2

细胞、在猪全血中存活及分解 DNA 能力显著降低。金黄色葡萄球菌在感染宿主的过程中,DNA 核酸酶降解 NETs 中 DNA,进而核苷酸酶进一步降解产生脱氧腺苷和磷酸根,产生脱氧腺苷介导巨噬细胞凋亡,促进细菌在体内增殖<sup>[19]</sup>。本实验首次证实猪链球 SsnA 也可促进细菌降解 DNA 产生磷酸根,提示产生更多的脱氧腺苷。是否猪链球菌 SsnA 也能参与细菌介导宿主免疫细胞凋亡,促进细菌在体内增殖,值得后续深入研究。

### 参考文献

- [1] Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Veterinary Microbiology*, 2000, 76(3): 259–272.
- [2] Allgaier A, Goethe R, Wisselink HJ, Smith HE, Valentin-Weigand P. Relatedness of *Streptococcus suis*



- isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(2): 445–453.
- [3] Yu WL, Li CL, Wang GP, Lu CP. Pathogenic characteristics of *Streptococcus suis* type 2 and type 9 isolated from Guangdong province. *Veterinary Science in China*, 2007, 37(8): 650–654. (in Chinese)  
余炜烈, 李春玲, 王贵平, 陆承平. 猪链球菌 2 型和 9 型广东分离株的病原特性. *中国兽医科学*, 2007, 37(8): 650–654.
- [4] Tang F, Pan ZH, Li DZ, Ma L, Xiong Y, Lu CP. Isolation and characterization of a *Streptococcus suis* serotype 9 from a wild cat. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(2): 275–282. (in Chinese)  
汤芳, 潘子豪, 李德志, 马琳, 熊毅, 陆承平. 一株分离自流浪猫的猪链球菌 9 型的分子生物学鉴定. *微生物学报*, 2016, 56(2): 275–282.
- [5] Wu ZF, Zhang W, Lu CP. Comparative proteome analysis of secreted proteins of *Streptococcus suis* serotype 9 isolates from diseased and healthy pigs. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 45(3): 159–166.
- [6] Kerdsin A, Hatrongjit R, Gottschalk M, Takeuchi D, Hamada S, Akeda Y, Oishi K. Emergence of *Streptococcus suis* serotype 9 infection in humans. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, doi: 10.1016/j.jmii.2015.06.011.
- [7] Berends ETM, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Kückritz-Blickwede M. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *Journal of Innate Immunity*, 2010, 2(6): 576–586.
- [8] Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, Feramisco J, Nizet V. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Current Biology*, 2006, 16(4): 396–400.
- [9] Uchiyama S, Andreoni F, Schuepbach RA, Nizet V, Zinkernagel AS. DNase *sda1* allows invasive MIT1 group A *Streptococcus* to prevent TLR9-dependent recognition. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(6): e1002736.
- [10] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid*, 2001, 46(2): 140–148.
- [11] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Construction and characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors. *Plasmid*, 2001, 45(2): 101–113.
- [12] Wu ZF, Shao J, Ren HY, Tang HY, Zhou MY, Dai J, Lai LY, Yao HC, Fan HJ, Chen D, Zong J, Lu CP. A *Streptococcus suis* LysM domain surface protein contributes to bacterial virulence. *Veterinary Microbiology*, 2016, 187: 64–69.
- [13] Ju CX, Gu HW, Lu CP. Characterization and functional analysis of *atl*, a novel gene encoding autolysin in *Streptococcus suis*. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(6): 1464–1473.
- [14] Wu ZF, Wu CY, Shao J, Zhu ZZ, Wang WX, Zhang WW, Tang M, Pei N, Fan HJ, Li JG, Yao HC, Gu HW, Xu X, Lu CP. The *Streptococcus suis* transcriptional landscape reveals adaptation mechanisms in pig blood and cerebrospinal fluid. *RNA*, 2014, 20(6): 882–898.
- [15] Shao J, Zhang W, Wu ZF, Lu CP. The truncated major pilin subunit *sbp2* of the *srtBCD* pilus cluster still contributes to *Streptococcus suis* pathogenesis in the absence of pilus shaft. *Current Microbiology*, 2014, 69(5): 703–707.
- [16] de Buhr N, Neumann A, Jerjomiceva N, von Kückritz-Blickwede M, Baums CG. *Streptococcus suis* DNase *SsnA* contributes to degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) and evasion of NET-mediated antimicrobial activity. *Microbiology*, 2014, 160(Pt 2): 385–395.
- [17] Li JQ, Tan C, Zhou Y, Fu SL, Hu LL, Hu J, Chen HC, Bei WC. The two-component regulatory system *CiaRH* contributes to the virulence of *Streptococcus suis* 2. *Veterinary Microbiology*, 2011, 148(1): 99–104.
- [18] 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.
- [19] Thammaravongsa V, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science*, 2013, 342(6160): 863–866.
- [20] Fontaine MC, Perez-Casal J, Willson PJ. Investigation of a novel DNase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and Immunity*, 2004, 72(2): 774–781.
- [21] Haas B, Bonifait L, Vaillancourt K, Charette SJ, Gottschalk M, Grenier D. Characterization of DNase activity and gene in *Streptococcus suis* and evidence for a role as virulence factor. *BMC Research Notes*, 2014, 7: 424.

## Relationship between DNA nuclease and the virulence of *Streptococcus suis* serotype 9

Huanyu Tang<sup>1,2,3</sup>, Haiyan Ren<sup>1,2,3</sup>, Zongfu Wu<sup>1,2,3\*</sup>, Chengping Lu<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

<sup>3</sup> OIE Reference Laboratory for Swine Streptococcosis, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

**Abstract: [Objective]** In addition to *Streptococcus suis* serotype 2, *Streptococcus suis* serotype 9 (SS9) is also a currently prevalent serotype and a zoonotic pathogen. In our previous study, SS9 DNA nuclease (SsnA) was considered as a candidate virulence factor. To clarify the impact of SsnA on SS9 virulence, we constructed *ssnA* mutant ( $\Delta$ *ssnA*) and studied its biological functions. **[Methods]** We evaluated the virulence of wild type strain and  $\Delta$ *ssnA* in a zebrafish infection model and compared the adherence rate to HEp-2 cells, the survival rate in pig blood, and enzymatic activity between wild type strain and  $\Delta$ *ssnA*. **[Results]** In a zebrafish infection experiment, the 50% lethal dose value of  $\Delta$ *ssnA* was 11.2-fold higher than that of wild type strain. The adherence rate of  $\Delta$ *ssnA* to HEp-2 cells was only 60.61% of the wild strain level. The survival rate of  $\Delta$ *ssnA* in pig blood was declined to 71.88% of wild strain level. The enzymatic activity assay showed that SsnA can degrade both linear and circular DNA. **[Conclusion]** SsnA contributes to SS9 virulence in a zebrafish infection model, the adherence to HEp-2 cells, and the survival in pig blood. SsnA is indeed an essential virulence factor for SS9.

**Keywords:** *Streptococcus suis* serotype 9, DNA nuclease, virulence factor

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars (Zongfu Wu, Nanjing Agricultural University), by the National Natural Science Foundation of China (31572544), by the Special Fund for Public Welfare Industry of Chinese MoA (201303041) and by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84398606; E-mail: wuzongfu@njau.edu.cn

Received: 2 June 2016; Revised: 6 December 2016; Published online: 23 December 2016