

溶原性噬菌体在猪链球菌 2 型分离株中的检出和鉴定

马玉玲, 陆承平*, 范红结

(南京农业大学 农业部动物疫病与免疫重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要:【目的】为了研究噬菌体整合酶基因在猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* type 2, SS2)中的分布情况。【方法】根据噬菌体整合酶基因设计引物, 建立了 PCR 方法, 并对扩增产物进行测序。【结果】结果显示, 25 株 SS2 致病菌株均扩增出目的片段, 非毒力株 T15、5 株其它血清型猪链球菌及兰氏 C 群猪源链球菌未扩增出目的片段。经丝裂霉素 C 诱导后, SS2 致病菌株出现完全的细胞溶解, 而非毒力株 T15 未出现溶解。SS2 致病株 HA9801 和 ZY05719 诱导均产生溶原性噬菌体, 分别命名为 SS2-HA 和 SS2-ZY, 电镜观察, 二者均头部呈正六边形, 无尾部, 其核酸类型为 dsDNA, 可鉴定为复层噬菌体科(*Tectiviridae*)的成员。噬菌体 SS2-HA 和 SS2-ZY 整合酶基因序列与已报道的 SS2 噬菌体整合酶基因序列高度同源, 显示 SS2 噬菌体整合酶具有较高的特异性。【结论】从 SS2 致病株中检出溶原性噬菌体和噬菌体整合酶基因, 且噬菌体整合酶基因与 SS2 溶菌酶释放蛋白(*mrp*)等 7 种毒力相关基因有相关性, 表明 SS2 的溶原性噬菌体可能与其致病性有关。

关键词: 猪链球菌 2 型; 溶原性噬菌体; 诱导

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 04-0508-06

SS2 是一种革兰氏阳性菌, 在全世界广泛分布, 与仔猪的脑膜炎、关节炎、心内膜炎等有很大的关联^[1]。此外, 也可引起人的脑膜脑炎、心内膜炎及永久性的听力丧失^[2]。该菌可以定殖于猪的扁桃体, 在猪群有很高的携带率^[3]。SS2 菌株可分为毒力株、弱毒力株和无毒力株^[4]。已知的毒力因子有溶菌酶释放蛋白、胞外因子、溶血素、荚膜多糖等, 但并不能完全解释强弱菌株的差异^[5]。最近的研究表明, 基因交换是猪链球菌菌群进化过程中的一个重要环节, 其中包括如溶血素等毒力因子的多种组合^[6, 7]。此外, King 等研究表明, 荚膜合成相关基因能通过猪链球菌菌群水平转移^[8]。因此, 对 SS2 噬菌体的研究, 有助于解决噬菌体介导的毒力因子和猪链球菌遗传进化等方面的问题。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基: SS2 型菌株、猪链球菌 1 型、7 型、9 型、和兰氏 C 群共 32 个菌株由本实验室保存, 1998-2005 从江苏、上海、四川等地分离, 详情见表 1。无毒力株 T15 由荷兰 Smith HE 博士惠赠。培养猪链球菌及分离噬菌体所用的培养基为 THB 培养基。制备双层平板时, 上层加 0.7% 的琼脂, 下层加 1.5% 的琼脂。

1.1.2 主要试剂和仪器: 2×Taq PCR MasterMix、D2000 DNA Marker、RNase I、蛋白酶 K、割胶回收试剂盒均购自北京天为时代科技有限公司; pMD18-T 载体购自大连宝生生物工程有限公司; 丝裂霉素 C 购

基金项目: 国家“973 项目”(2006CB504403); 国家自然科学基金(30771605)

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

作者简介: 马玉玲(1977-), 女, 新疆伊犁人, 博士, 研究方向为兽医微生物学与免疫学。E-mail: yulingm@126.com

收稿日期: 2007-10-24; 修回日期: 2007-12-16

自阿敏生物公司; THB 培养基、琼脂糖及琼脂粉购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 上公布的猪链球菌 89/1591 株的噬菌体整合酶 (phage integrase) 基因序列, 利用 Primer5.0 软件设计一对引物, 设计的引物序列如下: P1: 5'-GCTGGAGTCTTTGTTTGGTC-3', P2: 5'-GGTTATGCAGAAAGACTTGG-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 噬菌体整合酶基因的克隆和序列分析

待检菌接种 THB 液体培养基过夜培养, 取 1 μ L 作为模板, 应用 PCR 检测菌株中的噬菌体整合酶基因。PCR 反应体系为 25 μ L: 2 \times Taq PCR MasterMix 12.5 μ L, P1、P2 引物各 0.5 μ L, 去离子水 10.5 μ L, 模板 1 μ L。扩增参数为: 94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳, 凝胶成像系统观察并记录结果。

利用小量胶回收试剂盒提纯 PCR 扩增的噬菌体整合酶基因扩增产物, 并将基因片断与 pMD18-T 载体连接, 转化至 100 μ L TG1 感受态细胞中, 涂布于含有 X-Gal/IPTG/Amp 的 LB 琼脂平板培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18~24h, 观察单个菌落。挑取白色菌落, 接种于 5mL 终浓度为 50 μ g/mL 的 Amp(100mg/mL) LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜振荡培养, 并进行 PCR 鉴定以确认 T 载体中确实插入了外源基因片断。

取 1mL 上述菌液由宝生物工程(大连)有限公司负责测序, 测序结果用 BLAST 进行序列分析。

1.4 噬菌体的诱导

将以上菌株接种 THB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡 2~4h, 使菌液的 OD 值达到 0.2, 加入 4 倍体积的新鲜 THB 液体培养基, 并加入丝裂霉素 C 至终浓度 0.5 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C 120r/min 继续振荡 14h, 加入氯仿后再振荡 15min, 4 $^{\circ}$ C 4000 \times g 离心 30min, 上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 滤液即为噬菌体液, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 噬菌斑的观察

以 SS2 作为指示菌, 利用双层琼脂平板法(底层平板用 1.5%琼脂, 顶层用 0.7%琼脂)观察噬菌体的噬菌斑形态, 将噬菌体滤液作梯度稀释, 分别稀释 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴。取 300 μ L 上述噬菌体稀释液与 200 μ L 宿主菌混匀, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min 后与 45 $^{\circ}$ C 左右已熔化的顶层琼脂混匀, 并加入 2.5mol/L

CaCl₂ 至终浓度 1mol/L, 混合均匀后浇注在底层平板上, 室温放置 30min 后倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 10~12h, 观察噬菌斑。

1.6 电镜观察

在噬菌体滤液中加入 DNase 和 RNase A 至终浓度均为 1 μ g/mL, 室温温浴 30min, 消化裂解后释放出的核酸, 防止噬菌体颗粒被宿主菌核酸黏性溶液带走。加入氯化钠至终浓度为 1mol/L, 冰浴 1h, 以促进噬菌体颗粒与细胞碎片之间的分离; 4 $^{\circ}$ C 11000 \times g 离心 10min, 去除细胞碎片, 收集上清。在收集的上清中加入 PEG8000 至终浓度 10%(m/V)室温搅拌溶解后冰浴 1h, 使噬菌体颗粒发生沉淀。4 $^{\circ}$ C 11000 \times g 离心 10min, 弃上清, 使剩余液体充分流干, 用移液器吸去残余的液体。用一带橡皮球的宽口吸管将噬菌体沉淀轻轻重悬于噬菌体悬浮液中。将离心管倾斜放置, 使噬菌体悬浮液完全覆盖并浸泡噬菌体沉淀, 室温放置 1h。通过加入等体积的氯仿抽提噬菌体悬浮液的 PEG 和细胞碎片, 温和振荡 30 s。4 $^{\circ}$ C, 3000 \times g 离心 15min 以分离有机相和亲水相, 回收含噬菌体的亲水相。在离心管中制备甘油分级梯度: 取 3mL 含 40%甘油的 SM, 加入至管底; 在 40%甘油溶液上小心加入 4mL 含 5%甘油的 SM; 在 5%甘油上层小心加入噬菌体悬浮液。分级梯度于 4 $^{\circ}$ C 3500r/min 离心 3h。去上清加 1mL 噬菌体悬浮液重悬沉淀。用等体积氯仿抽提噬菌体悬液中的 PEG 和细胞碎片, 通过离心回收含噬菌体颗粒的亲水相, 取少量亲水相用 2%的磷钨酸(pH6.7)负染 1min, 透射电镜观察病毒粒子形态。

1.7 核酸类型的测定

提取诱导出的噬菌体核酸分别用 DNase I、RNase A 和 Mung Bean Nuclease 37 $^{\circ}$ C 酶解后用 0.8%的琼脂糖进行琼脂糖凝胶电泳分析, 并将提取的大肠杆菌 stx 噬菌体 SH Φ 114DNA 作为对照。

1.8 噬菌体中噬菌体整合酶基因的检测

参照 1.3 所述的方法检测诱导出的噬菌体中的噬菌体整合酶基因, PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳, 凝胶成像系统观察并记录结果。

1.9 噬菌体中噬菌体整合酶基因的克隆与核苷酸序列分析

参照 1.3 所述的方法回收提纯 PCR 扩增的噬菌体整合酶基因扩增产物, 并将基因片断与 pMD18-T 载体连接, 转化感受态细胞进行 PCR 鉴定以确认 T 载体中确实插入了外源基因片断。取 1mL 上述菌液由

宝生物工程(大连)有限公司负责测序, 测序结果用 BLAST 进行序列分析。

2 结果

2.1 噬菌体整合酶基因的 PCR 检测

采用本试验设计的一对引物建立的 PCR 方法检测 25 株 SS2 致病株均扩增出目的片段, 非毒力株 T15、5 株其它血清型猪链球菌(SS1、SS7、SS9)及兰氏 C 群猪源链球菌均未扩增出目的片段, 检测结果见表 1 和图 1。

2.2 SS2 菌体中的噬菌体整合酶基因的核苷酸序列分析将测序结果与 GenBank 中的序列进行同源性分析, 结果表明, HA9801 和 ZY05719 菌体的整合酶基因片断的核苷酸序列与 SS2 中国分离株 98HAH33 株和

05ZYH33 株菌体的噬菌体整合酶基因序列同源性为 100%, 与 SS2 北美分离株 89/1591 株的同源性为 98.5%。

2.3 噬菌斑观察

SS2 致病株在加入丝裂霉素 C 诱导后仍为清亮的, 接种 THB 平板 37 培养 16h 未见细菌生长, 而非毒力株 T15 诱导后颜色浑浊, 接种 THB 平板 37 培养 16h 有细菌生长。将新诱导的噬菌体滤液做不同稀释后以不同猪链球菌菌株作指示菌浇注双层琼脂平板, 37 培养 16h 均未见噬菌斑。

2.4 噬菌体形态观察

用 2% 磷钨酸复染纯化的噬菌体颗粒, 在 JEM-1230 透射电子显微镜下观察 SS2 致病株 HA9801 和 ZY05719 诱导的噬菌体 SS2-HA 和 SS2-ZY

表 1 猪源链球菌的噬菌体整合酶基因的 PCR 检测

Table 1 The results of bacteriophage integrase gene detection by PCR in swine streptococcal strains

Strains	Source	Year	Serotype	<i>gdh</i>	<i>cps2</i>	<i>epf</i>	<i>mrp</i>	<i>sly</i>	<i>fbps</i>	<i>orf2</i>	<i>integrase</i>
HA9801	Jiangsu(江苏)	1998	2	+	+	+	+	+	+	+	+
HA9802	Jiangsu(江苏)	1998	2	+	+	+	+	+	+	+	+
HA9803	Jiangsu(江苏)	1998	2	+	+	+	+	+	+	+	+
ZY05719	Sichuan(四川)	2005	2	+	+	+	+	+	+	+	+
ZY05721	Sichuan(四川)	2005	2	+	+	+	+	+	+	+	+
ZY05722	Sichuan(四川)	2005	2	+	+	+	+	+	+	+	+
GH05458	Sichuan(四川)	2005	2	+	+	+	+	+	+	+	+
ZG05464	Sichuan(四川)	2005	2	+	+	+	+	+	+	+	+
YG05465	Sichuan(四川)	2005	2	+	+	+	+	+	+	+	+
CHZ05806	Anhui(安徽)	2005	2	+	+	+	+	+	+	+	+
JR05730	Jiangsu(江苏)	2005	2	+	+	+	+	+	+	+	+
JDZ05802-1	Jiangxi(江西)	2005	2	+	+	+	+	+	+	+	+
260(human)	Sichuan(四川)	2005	2	+	+	+	+	+	+	+	+
SH04wu	Shanghai(上海)	2004	2	+	+	+	+	+	+	+	+
SH29	Shanghai i(上海)	2004	2	+	+	-	+	+	+	+	+
SH0519	Shanghai i(上海)	2004	2	+	+	+	+	+	+	+	+
SH0505	Shanghai i(上海)	2004	2	+	+	+	+	+	+	+	+
SS2-1	Jiangsu(江苏)	1998	2	+	+	+	+	+	+	+	+
SS2-2	Jiangsu(江苏)	1998	2	+	+	+	+	+	+	+	+
SS2-3	Jiangsu(江苏)	1999	2	+	+	+	+	+	+	+	+
SS2-4	Jiangsu(江苏)	1999	2	+	+	+	+	+	+	+	+
SS2-6	Shanghai(上海)	1999	2	+	+	+	+	+	+	+	+
SS2-H	Jiangsu(江苏)	1999	2	+	+	+	+	+	+	+	+
1-3	Jiangsu(江苏)	1998	2	+	+	+	+	+	+	+	+
2-4	Jiangsu(江苏)	1998	2	+	+	+	+	+	+	+	+
T15	German	2006	2	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC43765	Ganada	2004	1	+	-	-	-	+	-	+	-
SH000470	Shanghai(上海)	2000	1	+	-	-	-	+	-	+	-
SH040805	Shanghai(上海)	2004	7	+	-	-	-	+	-	+	-
SH040917	Shanghai(上海)	2004	9	+	-	-	-	-	-	+	-
JXD41226	Jiangxi(江西)	2004	9	+	-	-	-	-	-	+	-
ATCC35246	Sichuan(四川)	1976	C	-	-	-	-	-	-	-	-

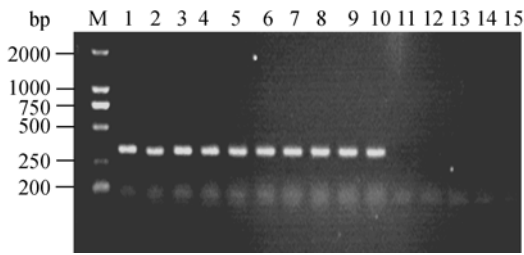


图 1 噬菌体整合酶基因的 PCR 检测

Fig. 1 The detection of integrase gene. M.MarkerDL2000; 1. HA9801; 2. HA9802; 3. ZY05719; 4. ZY05721; 5. ZY05722; 6. JR05730; 7. GH05458; 8. ZG05464; 9. YG05465 10. JDZ05802-1; 11. T15; 12. SH28; 13. SH040805; 14. SH040917; 15. Control.

的形态, 这些噬菌体的头部均呈现正六边形轮廓, 无尾部(图 2)。经测量其头部的长度均约 50nm。同样方法处理的非毒力株 T15 在电子显微镜下未观察到噬菌体颗粒。

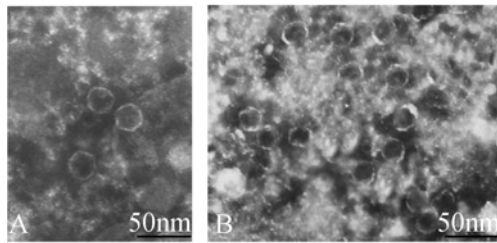


图 2 透射电镜下观察到的噬菌体结构

Fig. 2 Transmission electron micrograph of SS2 bacteriophages. A: SS2-HA; B: SS2-ZY.

2.5 核酸类型的测定

电泳结果表明核酸可以被 DNase 消化, 而不被 RNase A 或 Mung Bean Nuclease 消化, 电泳后呈一条带, 说明诱导的噬菌体核酸为 dsDNA(图 3)。

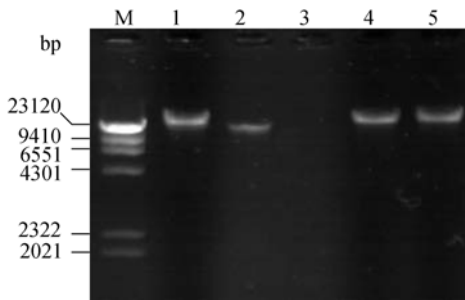


图 3 噬菌体基因组的核酸类型鉴定

Fig. 3 Analysis of phage genomic nucleic acid digested with DNA or RNA specific nucleases.M. Marker; 1. SS2-HA nucleic acid; 2. SHφ114 DNA; 3-5. SS2-HA nucleic acid digested with DNase, RNase A and Mung Bean Nuclease.

2.6 噬菌体中噬菌体整合酶基因的检测与序列分析

噬菌体 SS2-HA 和 SS2-ZY 均扩增出目的片段, 将测序结果与从 SS2 菌体中扩增的噬菌体整合酶基

因序列进行同源性分析, 结果表明, 噬菌体 SS2-HA 和 SS2-ZY 的整合酶基因的核苷酸序列与 HA9801、ZY05719 菌体中的整合酶基因核苷酸序列完全一致。

3 讨论

噬菌体是感染细菌、霉形体、螺旋体、放线菌以及蓝细菌等的一种病毒, 亦称细菌病毒。根据与寄主细菌的相互关系可分为溶原化和溶菌反应两种类型^[9]。烈性噬菌体由于对其宿主菌的裂解作用, 在菌型分型及生物学控制细菌感染方面有着重要的作用。溶源性噬菌体以溶原化形式在基因水平转移、细菌种群的遗传多样性等方面发挥重要的作用, 此类研究已日渐引起人们的关注^[10]。

近年来研究表明, 全球性暴发性感染疾病与病原菌的“遗传因子转移”有密切关系, 其中噬菌体作为最大的可转移遗传因子起着重要的作用^[11-14]。由于噬菌体在基因水平转移、细菌种群的遗传多样性等方面都发挥着重要的作用, 逐渐成为关注的热点。但目前对噬菌体的研究主要集中于大肠杆菌等革兰氏阴性菌, 而对革兰氏阳性菌甚少涉及, 主要是关于结核杆菌^[15]和耐热链球菌(*S. thermophilus*)噬菌体的研究^[16], 有关猪链球菌则仅国外有关于溶源性噬菌体的报道^[17], 国内则尚未见报道。

基因交换是猪链球菌菌群进化过程中的一个重要环节, 基因水平转移对 SS2 基因的多样性起重要的作用, 噬菌体可能将自身的遗传物质整合到 SS2 基因组上导致新血清型的出现, 往往携带一些与毒力相关的基因使得其宿主菌产生相应的酶或毒素, 导致宿主菌毒力的增强。因此, 对 SS2 溶源性噬菌体进行研究有助于揭示 SS2 的致病机理、分子流行病学特征及制定可靠的预防体系。

溶源性噬菌体在宿主菌染色体上的整合和切离是噬菌体整合酶介导的过程。噬菌体整合酶属于“位点特异性重组酶”类, 大多来自原核或真核微生物, 它们能在 30~40bp 长的序列范围内发挥切离和整合的酶学活性功能。国内外尚未对 SS2 的噬菌体整合酶进行研究, 本研究将为 SS2 溶源性噬菌体定点整合的机理、溶源性噬菌体与宿主菌相互关系及前噬菌体基因组学的研究提供依据。

SS2 分为致病株与非毒力株, 致病株引起猪脑膜炎、关节炎、心内膜炎、败血症、肺炎等严重的临床症状, 可致猪突然死亡, 并感染致死人; 非毒力株常见于正常的猪的呼吸道, 不引起临床症状。猪链球

菌的主要毒力因子包括: 溶菌酶释放蛋白(*mrp*), 胞外因子(*epf*), 谷氨酸脱氢酶(*gdh*), 荚膜多糖(*cps*), 纤连蛋白/血纤蛋白原结合蛋白(*fbps*), 溶血素(*sly*), 毒力相关序列(*orf2*)等。猪链球菌的致病性强弱与其有关。本研究采用的 25 株 SS2 国内分离株, 96%(24/25) 表现为 *cps2/gdh+/epf+/mrp+/sly+/fbps+/orf2+*, 仅 1 株表现为 *cps2/gdh+/epf-/mrp+/sly+/fbps+/orf2+*^[18], 这 25 株 SS2 分离株, 均扩增出噬菌体整合酶基因的目的片段, 而非毒力株 T15 未扩增出目的片段, 提示噬菌体整合酶基因可能与 SS2 的致病性有关, 可考虑将其作为 SS2 毒力基因的检测指标。

本试验从 SS2 致病菌株中检出溶原性噬菌体, 非毒力株 T15 中未检出。对诱导出的溶原性噬菌体进行了形态学和核酸类型鉴定, 鉴定所检测的 SS2-HA 和 SS2-ZY 与耐热链球菌 P37-14 噬菌体属于同一科, 同为复层噬菌体科(*Tectiviridae*)的成员。

噬菌体 SS2-HA 和 SS2-ZY 整合酶基因序列与 SS2 中国分离株 98HAH33 株、05ZYH33 株及 SS2 北美分离株 89/1591 株的噬菌体整合酶基因高度同源。由于噬菌体整合酶具有宿主特异性, 它决定了某一噬菌体能否感染相应的宿主菌, 因此噬菌体整合酶基因的特异性可作为噬菌体鉴定的重要指标。就目前而言, 尚未见有关复层噬菌体整合酶的报道, 因此尚无法进行进一步的比较。

目前国内对 SS2 的研究以流行病学、病原学及毒力基因的分子水平检测等方面居多, 而对其噬菌体的研究尚未报道。噬菌体整合酶基因和溶原性噬菌体均存在于 SS2 致病株的特点表明, SS2 的溶原性噬菌体可能与其致病性有一定的相关性。对 SS2 溶原噬菌体的检测、是否能进行毒力基因的水平转移、基因水平转移的条件、溶原转换与细菌毒力的相关性等进行研究, 这不仅可以从新的视角深入对猪链球菌的研究, 而且通过对革兰氏阳性菌的噬菌体的深入研究, 可将噬菌体研究提高到新的水平。

参 考 文 献

- [1] Chanter N, Jones PW, Alexander TJ. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis*: A speculative review. *Vet Microbiol*, 1993, 36: 39–55.
- [2] Arends JP, Zanen HC. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis*, 1988, 10: 131–137.
- [3] Arends JP, 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: 945–947.
- [4] Vecht U, Wisselink HJ, Van Dijk JE, et al. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infect Immun*, 1992, 60: 550–556.
- [5] 田云, Frank M, Aarestrup, 陆承平. 猪链球菌 2 型可能的毒力基因分布. 农业生物技术学报 (*Journal of Agricultural Biotechnology*), 2004, 12(5): 530–533.
- [6] Sekizaki T, Otanti Y, Osaki M, et al. Evidence for horizontal transfer of *SsuDAT11* restriction-modification genes to the *Streptococcus suis* genome. *J. Bacteriol*, 2001, 183: 500–511.
- [7] Takamatsu D, Osaki M, and Sekizaki T. Evidence for lateral transfer of the *sulysin* gene region of *Streptococcus suis*. *J. Bacteriol*, 2002, 184: 2050–2057.
- [8] King SJ, Leigh JA, Heath PJ, et al. Identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(10): 3671–80.
- [9] 陆承平. 兽医微生物学第四版. 北京: 中国农业出版社, 2007, 474–478.
- [10] Karaolis DK, Somara S, Maneval DR, et al. A bacteriophage encoding a pathogenicity island: a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*, 1999, 399: 375–379.
- [11] Galan J E, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 1999, 284: 1322–1328.
- [12] Zhou D, Mooseker M S, Galan J E. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science*, 1999, 283: 2092–2095.
- [13] Mirol S, Rash W, Rohde M, et al. Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella typhimurium* strain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9845–9850.
- [14] Figueroa-Bossi N, Bossi L. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Mol Microbiol*, 1999, 33: 167–176.
- [15] 矫庆辉, 韩中波, 蒋平. 噬菌体裂解法检测结核杆菌的临床应用研究. 中国防痨杂志 (*The Journal of the Chinese Antituberculosis Association*), 2004 Vol.26(5): 308.
- [16] Bruttin A, Desiere F, d'Amico N, et al. Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in a cheese factory. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(8): 3144–3150.
- [17] Harel J, Martinez G, Nassar A. Identification of an inducible bacteriophage in a virulent strain of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun*, 2003, Oct; 71(10): 6104–6108.
- [18] 赵冉, 孙建和, 陆承平. 猪链球菌国内分离株毒力因子的分布特征. 上海交通大学学报 (农业科学版) [*Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*], 2006, 24(6): 495–498.

Isolation and Identification of the Temperate Bacteriophage from Isolated Strains of *Streptococcus suis* Serotype 2

Yuling Ma, Chengping Lu^{*}, Hongjie Fan

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A PCR assay was developed to study the distributional characteristics of phage integrase gene in *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2). A 323bp distinct DNA target can be amplified in 25 strains of virulent SS2, while can not be amplified in avirulent strain T15, 5 strains of other serotypes (SS1, SS7, SS9) and strains of group C *Streptococcus* strains from pigs, which suggested that the phage integrase gene may be related to the pathogenicity of SS2 and can be consider as a detection factor of the virulent gene of SS2. The sequencing and restriction endonuclease analysis of the PCR products were also done. Comparisons between the sequences of phage integrase gene with that of SS2 strain, showed a high homology with SS2 China strains 98HAH33, 05ZYH33 and North American strain 89-1591. Complete cell lysis was observed with SS2 virulent strains but not with avirulent strain T15 after the induction by mitomycin C. Electron microscopy analysis of the lysate from SS2 virulent strains HA9801 and ZY05719 revealed the presence of phage particles. The induced phage, named SS2-HA and SS2-ZY, both have a small isometric nucleocapsid approximately 50 nm in diameter and have no tail and is therefore a member of the *Tectiviridae* family. The phage integrase gene sequence of phage SS2-HA and SS2-ZY shared high homologue identities with virulent SS2 strains, which suggested that the phage integrase gene of SS2 has high specify. The temperate phage and phage integrase gene can only detected from SS2 virulent strains but not from avirulent strain, and the detection of phage integrase gene was related to the virulence-associate factors of SS2, such as the *muramidase-released protein gene (mrp)*, which suggested that the temperate phage of SS2 may be related to the pathogenicity of SS2.

Keywords: *Streptococcus suis* type 2; temperate bacteriophage; induce

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2006CB504403) and the National Natural science foundation of China (30771605)

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

Received: 24 October 2007/ Revised: 16 December 2007

2008 年起《微生物学报》改为月刊

自 2004 年《微生物学报》改为大开本(8 个印张 128 页)以来,已经连续两次扩版(2005~2006 年为 160 页,2007 年为 176 页),发表周期有了明显的缩短。但是,由于近年来稿量不断增长,发表周期不得不再度延长,目前的双月刊已无法满足广大作者和读者的需要。为了加快科技信息更新速度,与国际接轨,在编辑部提议下,经主办单位同意并报主管部门正式批准,本刊自 2008 年开始将 1989 年以来一直沿用了 19 年的双月刊改为月刊,发行日是每月的 4 日。

希望广大作者和读者一如既往地支持《微生物学报》!