

## 体内表达新基因 *trag* 在猪链球菌的分布 及其免疫反应性分析

祝昊丹, 顾宏伟, 陆承平\*

(南京农业大学, 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:** 【目的】*trag*(transfer gene G)是利用 IVIAT(*in vivo* induced antigen technology)通量筛选鉴定的猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* type 2, SS2)感染相关因子, 研究该基因在猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)中的分布情况, 研究康复血清与免疫血清在免疫印迹中的反应性有无, 间接证明其在体内感染与体外培养时表达差异。【方法】鉴于我国分离株 *trag* 与 GenBank 公布的 SS2 北美株 89/1591 的 *trag* 序列有 95.8% 的同源性, 据此设计和合成一对检测引物, 对 SS2 我国江苏及四川流行株、其他临床分离株和参考株及 SS1、SS1/2、SS9、SS7 及 C 群猪源链球菌共 43 株进行 PCR 扩增。另设计一对引物, 扩增 5 株 SS 代表菌株 *trag* 的完整阅读框, 并对扩增产物进行测序。据软件分析后, 选择 TRAG(Transfer protein G)免疫原性良好的区域片段的核酸设计表达引物, PCR 扩增后定向克隆至表达载体 pET28a(+)构建表达质粒, 表达蛋白转印到 PVDF 膜上, 分别与 SS2 猪康复血清和猪高免血清反应。【结果】*trag* 在 SS2 中 94%(30/32)阳性, SS9 中 67%(4/6)阳性, SS7 阳性, SS1、SS1/2 及 C 群菌阴性。5 株细菌 TRAG 的氨基酸序列与 SS2 中国株 98HAH33、05ZYH33 及北美株 89/1591 同源性>97%。所获得重组蛋白只能被康复血清识别。【结论】从 SS 致病株中检出感染相关基因 *trag*, 提示该基因可能与 SS 致病性有关, 重组蛋白的免疫转印结果表明, TRAG 可能与 SS2 体内感染相关。

**关键词:** 猪链球菌 2 型; PCR 检测; Transfer protein G (TRAG); 鉴定

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 12-1642-07

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)在世界上分布范围极广, 荷兰(1951)和英国(1954)最早发现并报道了该病, 此后在养猪业发达的其他国家都有发生。根据 SS 表面荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)合成相关基因抗原差异可分为 35 个血清型(1-34, 1/2), 其中 2 型(*Streptococcus suis* type 2, SS2)流行最广, 致病性最强, 猪群携带率较高<sup>[1]</sup>。1998 年江苏和 2005 年四川相继暴发猪链球菌疫情, 备受世界关注<sup>[2]</sup>。近年来的研究认为 CPS 合成相关基因、溶菌酶释放蛋白(muramidase-released protein, MRP)、胞外因子(extracellular factor, EF)、溶血素(suilyisin, SLY)、IgG 结合蛋白、3-磷酸甘油脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase, GAPDH)、自溶素(autolysin)及胞外溶解物结合蛋白(extracellular solute-binding protein)等是其重要的可能毒力因子<sup>[3-9]</sup>。但在加拿大等地分离的强毒株并不产生 MRP、EF 等毒力相关蛋白, 表明 SS 存在复杂的致病机制。

细菌的分泌系统的发现是近年来细菌致病机制研究的重要进展, 其中 IV 型分泌系统(Type IV Secretion System, TFSS)与许多致病菌的毒力因子的转移、毒力蛋白的分泌有关。TFSS 在遗传上与大分子物质转移系统亲缘关系较近, 具有转运 DNA-蛋白质复合物、蛋白质亚基等大分子物质的能力。TFSS 包括结合转移装置、蛋白分泌系统、毒素输出装置和自然转化系统<sup>[10]</sup>。

基金项目: 国家“973 项目”(2006CB504403)

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

作者简介: 祝昊丹(1983-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士, 从事兽医微生物与免疫学研究。

收稿日期: 2008-04-15; 修回日期: 2008-06-20

TRAG(Transfer protein G)是采用 IVIAT(*in vivo* induced antigen technology)通量筛选鉴定出的 SS2 感染相关因子之一,进一步分析发现,TRAG 参与细菌分泌途径,是 TFSS 可能的组成成分。目前,国内外尚未有关于 SS2 的 TRAG 的报道。本试验通过 PCR 检测 SS2 我国 1998 年江苏及 2005 年四川两次流行株和其它临床分离株是否存在 *trag*,并分析该基因在其它猪链球菌的分布,同时扩增其 ORF 全基因,分析比较两次疫情代表株与国外分离株之间的差异。此外设计表达引物,PCR 扩增具有良好免疫原性的片段基因,并定向克隆至表达载体 pET28a(+)进行重组表达,表达蛋白转印后分别与感染 SS2 猪的康复血清和免疫血清反应,鉴定分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和实验动物** 猪链球菌 43 株,其中 SS2 强毒株 HA9801 于 1998 年分离自江苏海安;强毒株 ZY05719 于 2005 年分离自四川资阳;弱毒株 T15 由 Dr.H.Smith(DLO-Institute for Animal Science and Health,The Netherlands)惠赠;98012 和 T002 为 1998 年江苏人源株,由江苏省疾病预防控制中心惠赠;260 和 266 为 2005 年四川人源株,由四川省疾病预防控制中心惠赠;ATCC43765、11611 由德国 Giessen 大学 Baljer 教授惠赠,SH28(SS1)和 26S(SS1/2)由中国动物流行病学中心提供。设马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*)猪源 ATCC35246 参考株(1976 年分离自我国四川,由 ATCC 收藏)和海南分离株为对照,其它菌株的来源见表 1。Top10, BL21(DE3),均由本室保存。SPF 巴马系小型猪由上海交通大学华修国教授提供。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** *Taq* polymerase、dNTP、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、PCR 回收试剂盒及限制性内切酶 *EcoR*、*Xho* 均购自大连宝生物工程公司。IPTG、三羟甲基氨基甲烷(Tris-碱)、甘氨酸、N-N 二甲基甲叉丙稀酰胺、丙稀酰胺均购自南京生兴生物公司。PVDF 膜购自南京博全试剂公司, Biomertra PCR 仪:购自 Whatman 公司;凝胶成像分析系统:购自 Bio-Rad 公司;蛋白垂直电泳仪:购自 Bio-Rad 公司;DK-8D 数显恒温水浴锅:购自南京科宝仪器公司。半干转印仪:TE77 ECL Semi-Dry Transfer Unit 购自 Amersham 公司。

### 1.2 血清制备

**1.2.1 康复血清:**选取 3 只 30 日龄断奶 SPF 小型猪单独饲养,攻毒前采血,用 ELISA 检测血清效价<sup>[1]</sup>,以确保阴性。肌注攻毒和静脉注射,攻击株为 ZY05719,剂量  $1 \times 10^8$  CFU,1 mL/头,攻毒后每日观察临床症状,并每日记录猪直肠温度。3 周后将猪处死,收集血清,分装-20 保存备用。

**1.2.2 免疫血清:**将菌株 ZY05719 的 THB 培养物以 0.8% 甲醛灭活 48 h,浓度调至  $1 \times 10^9$  CFU,1 mL/头,经无菌检验合格后免疫 SPF 小型猪,首免后每两周免疫一次,共免疫 4 次,末次免疫后第 9 天,采血收集血清,-20 保存备用。

### 1.3 PCR

**1.3.1 模板制备:**将各保存菌种接种 THB 兔血平板 37 培养 16~18 h 后,挑取单菌落接种于 5 mL 含 2% 犊牛血清的 THB 液体培养基,37 培养 13 h。取各检测菌种新鲜培养菌液 500  $\mu$ L 离心弃上清,用 200  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 重悬后煮沸 10 min,分装,置-20 备用。

**1.3.2 引物设计与合成:**根据 GenBank 公布的 SS2 加拿大株 89/1591 *trag* 序列,利用 Primer5.0 软件设计引物,检测引物,上游引物 P1 :5'-CTTTGGACTCTTG GGTCTCG-3',下游引物 P2 :5'-CTTGGAAGCTTCCT GGAGGAT-3',产物为 772 bp;完整 ORF 扩增引物,上游引物 P3:5'-TAGAGTGACAGAACCTTCGGC A-3',下游引物 P4 :5'-GCTGGCGTCCACTCCGT-3',产物为 1928 bp;重组表达引物,上游引物 P5 :5'-CC GGAATTCAATGGTTCTCGCAGTG-3',下游引物 P6 :5'-CCGCTCGAGTTATTTGAAAGTTTCCTCG-3',产物为 711 bp;引物由上海 Sangon 公司合成。

**1.3.3 PCR 产物扩增:**在 PCR 反应管中依次加入 10 $\times$ buffer、25 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、10 mmol/L dNTPs、10  $\mu$ mol/L 上下游引物、5 U/ $\mu$ L *Taq* 酶及模板,最后加水定容至 25  $\mu$ L,混匀后立即进行 PCR 反应。PCR 循环参数:94 5 min;94 30 s;49 45 s;72 45 s;30 个循环;72 10 min;4 10 min 电泳检测。扩增完整 ORF 的 PCR 循环参数:94 5 min;94 30 s;55 45 s;72 2 min;30 个循环;72 10 min;4 10 min。

**1.3.4 PCR 产物的回收:**PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,紫外灯下切割目的条带,用 DNA 快速纯化试剂盒回收凝胶中目的片段,具体步骤按试剂盒说明书进行操作。

### 1.4 重组质粒的构建与鉴定

**1.4.1 测序用质粒的构建:**将经回收的 PCR 产物直

接与 T 载体连接, 转化进感受态细胞 Top10, 感受态细胞的制备按照分子克隆提供的  $\text{CaCl}_2$  法<sup>[12]</sup>, 经 PCR 和双酶切鉴定阳性的克隆送上海英骏生物技术公司测序。对测定结果进行序列分析, 并验证其阅读框。

**1.4.2 重组表达质粒的构建:** 以阅读框正确的阳性重组质粒为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物经 *EcoR* 和 *Xho* 酶切后与双酶切的质粒 pET28a(+) 连接, 转化进 Top10 感受态细胞, 经 PCR 和双酶切鉴定后, 将重组表达质粒转化进表达宿主菌 BL21(DE3), 进一步鉴定, 挑取阳性克隆测序。

### 1.5 序列分析

经鉴定后的阳性克隆送由上海 Invitrogen 公司测序, 将测序结果登陆 GenBank, 进行同源性比对, 利用 DNASTAR 将基因序列翻译成氨基酸后在 NCBI 数据库进行比对, 分析与其它蛋白之间的进化关系。

### 1.6 重组质粒的诱导表达

重组表达菌接种 Kan/LB 培养液(Kan 终浓度 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 37 振荡培养 3~4 h 后, 当菌液浓度达  $\text{OD}_{600}$  0.4~0.6 时, 加入异丙基- $\beta$ -D-半乳糖苷 IPTG 至终浓度 1 mmol/mL, 继续振荡培养 3~4 h, 离心收集沉淀, 加入 SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸 5 min, 含 pET28a(+) 的非重组质粒菌也同样处理。用 12% SDS-PAGE 检测表达情况。

### 1.7 免疫转印

采用半干转印方法<sup>[12]</sup>进行, pET28a-TRAG 经 SDS-PAGE 后以 0.65 mA/cm<sup>2</sup> 恒流转移 2 h, 待蛋白转移到 PVDF 膜后, 以 5% 脱脂奶粉 PBS 溶液封闭, 封闭后与 1:500 稀释的康复血清/免疫血清结合, 随之加入 1:1000 稀释的 HRP-SPA 作用 1 h, 最后以 DAB 显色。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增

SS2 菌株的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 出现一条 772 bp 的条带 (图略), 阴性对照组没有条带出现。

### 2.2 *trag* 的分布

43 株 SS 中, SS2 临床分离株 (30/32) 出现约 772 bp 条带, SS7、SS9 也出现相应条带, 而 C 群猪源链球菌、SS1、SS1/2、SS2 无毒株 T15、ATCC43765 未出现相应条带 (表 1)。

### 2.3 序列分析

SS2 ZY05719、HA9801、98012、SS7 SH040805、SS9 SH040917 等 5 株细菌的 TRAG 的编码基因全长

表 1 *trag* 在猪链球菌的分布

Table 1 Distribution of *trag* in different *Streptococcus suis* isolates

Strain	Source	Year	<i>trag</i>
<i>Streptococcus suis</i> type 2			
HA9801	Jiangsu	1998	+
HA9802	Jiangsu	1998	+
SS2-6	Shanghai	1999	+
SS2-H	Jiangsu	1999	+
LA21	Anhui	2005	+
YZ060720	Jiangsu	2006	+
LD060816	Hunan	2006	+
YY000816	Hunan	2006	+
XT060821	Hunan	2006	+
HA060821	Jiangsu	2006	+
GZ061121	Guangdong	2006	+
JA070109	Zhejiang	2007	+
BB070118	Anhui	2007	+
ZY05719	Sichuan	2005	+
ZY05721	Sichuan	2005	+
ZY05722	Sichuan	2005	+
ZG05464	Sichuan	2005	+
YJ05465	Sichuan	2005	+
JDZ05802	Jiangxi	2005	+
11611	Germany	N	+
T15	Holand	N	-
98012 (human)	Jiangsu	1998	+
T002 (human)	Jiangsu	1998	+
191 (human)	Sichuan	2005	+
260 (human)	Sichuan	2005	+
258 (human)	Sichuan	2005	+
259 (human)	Sichuan	2005	+
250 (human)	Sichuan	2005	+
224 (human)	Sichuan	2005	+
227 (human)	Sichuan	2005	+
183 (human)	Sichuan	2005	+
ATCC43765	Germany	N	-
89-1591	N	N	+
P1/7	N	N	-
SH28	Canada	N	-
<i>Streptococcus suis</i> type 9			
SH65	Guangdong	2006	+
SH06	Guangdong	2006	+
SH89	Guangdong	2006	-
SH2803	Guangdong	2006	-
SH04917	Shanghai	2004	+
JX041226	Jiangxi	2004	+
other serotype <i>Streptococcus suis</i>			
SH04805	Shanghai	2004	+
SH28	Canada	N	-
26S	Canada	N	-
<i>Streptococcus equi</i>			
ATCC35246	Sichuan	1976	-
HA01	Hainan	N	-

均为 1818 bp，序列号分别为 EF688563(ZY05719)、EU09399 (HA9801)、EU009400(98012)、EU022704 (SH040805)、EU072049(SH040917)。编码蛋白由 605 个氨基酸组成，软件分析其分子量为 69.4 kDa，等电点为 9.03。

将加拿大株 89/159、中国株 98HAH33、05ZYH33 和本实验测序的菌株共 8 株的氨基酸序列用 DNASRAR 软件比对分析，结果表明，中国 SS 株的 TRAG 高度保守，我国两次流行的 SS2 菌株 TRAG 完整 ORF 均由 605 个氨基酸组成，蛋白质同源性较高 98% 以上(图 1)。

#### 2.4 进化关系分析

在 NCBI 数据库中比对氨基酸序列，发现该蛋白与数据库中大量 TRAG/VIRD4 家族蛋白序列高度同源，如无乳链球菌（同源性 98%）、肺炎链球菌(同

源性 75%)。而在 GenBank 搜索发现相关核苷酸序列为数不多，将相关序列用 MegAlign 进行比对，构建进化树，并用 PHYlip 评估树的稳定性。进化关系表明 SS2、SS9 的 *trag* 与中国株 98HAH33、05ZYH33 在同一个分支上(图 2)，与 SS2 北美分离株 89/1591 的同源性小于中国株，而在 Sanger 数据库中搜索结果显示，欧洲株 P1/7 无相关序列，推其原因可能是 SS2 菌株间存在地理性差异。

#### 2.5 重组表达质粒的鉴定

PCR 扩增后，经双酶切、纯化，定向克隆到表达载体 pET28a 中，得到重组表达质粒 pET28a-TRAG，转化到大肠杆菌 Top10 后，挑取阳性克隆提取质粒经 *EcoR* 和 *Xho* 双酶切得到约 711 bp 片段，这表明目的片段已插入到表达质粒中(图 3)。

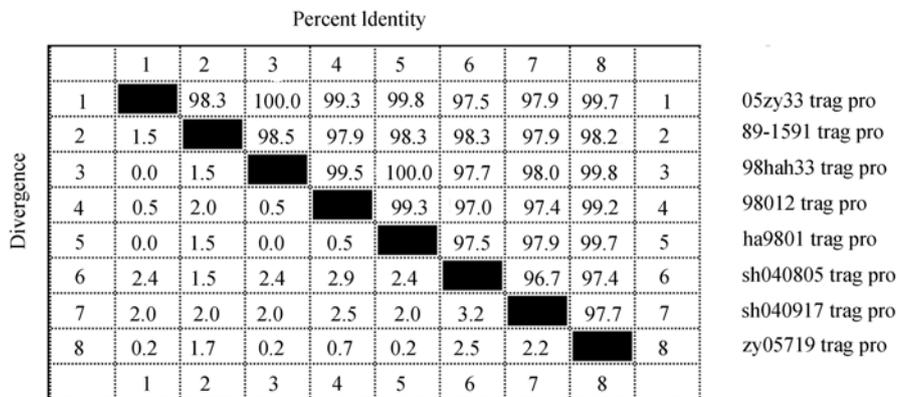


图 1 8 株 SS TRAG 序列差异性分析

Fig. 1 Sequence difference of TRAG among 8 SS isolates.

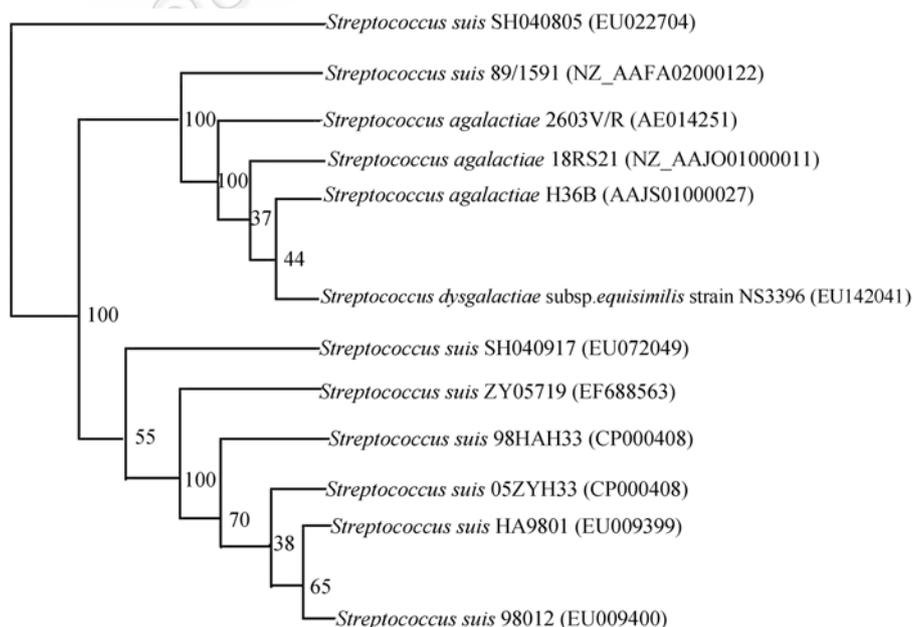


图 2 链球菌 *trag* 的进化关系树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *trag* of Streptococcal. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by PHYlip.

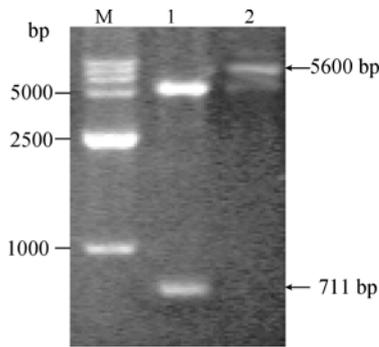


图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid. M. DL15000 marker; 1. fragment of recombinant plasmid by *EcoR* and *Xho* ; 2. fragment of pET28a(+) by *EcoR* and *Xho* .

## 2.6 诱导表达

重组质粒 pET28a-TRAG 在大肠杆菌中经 IPTG 诱导后, 重组菌全菌 SDS-PAGE 33 kDa 处出现一条明显变粗的条带, 其大小与预期融合蛋白理论分子量大小一致 (图 4-A)。空白对照的 (空表达载体) 相应位置未见相应的大小的蛋白条带, 表明 TRAG 得到表达。

显色结果表明, 与康复血清进行反应的, 在 PVDF 膜上重组蛋白处有一明显条带; 而用免疫血清结合的, PVDF 膜上重组蛋白处无显色条带, 对照为蛋白转印到 PVDF 膜后, 丽春红 S 显色 (图 4-B)。

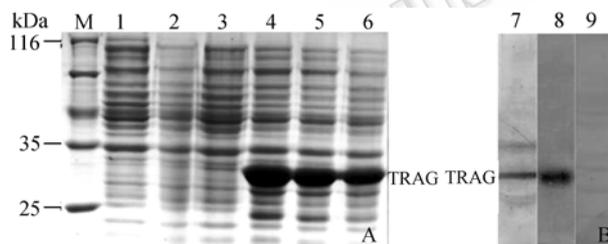


图 4 pET28a-TRAG/BL21 重组菌全菌 SDS-PAGE (A) 和免疫转印 (B)

Fig. 4 SDS-PAGE analysis (A) and Western-blot (B) of expression of recombinant proteins in BL21(DE3). A: M. Protein molecular weight marker; 1-3. pET 28a(+) induced by IPTG; 4-6. recombinant plasmid pET28a-TRAG was induced by IPTG at 4 h, 3 h and 2 h. B: 7-9. Western-blotting with convalescent sera. Staining with Ponceau S; Western blot with immune sera.

## 3 讨论

目前国内对 SS 的研究以流行病学、病原学及毒力因子的分子水平检测等方面居多, 而对其分泌系统的研究尚未见报道。本实验室采用 IVIAT, 用 SS2 猪

康复血清从基因表达文库中筛出包括 *trag* 在内的 48 种感染相关基因<sup>[13]</sup>, 本研究则以 *trag* 作为研究对象, 对其检测、蛋白鉴定分析, 间接证明 TRAG 仅在链球菌感染猪体内表达。

细菌的致病过程是一个动态的多因素参与的复杂过程, 为了适应宿主环境的变化, 致病菌下调非必需基因的表达, 上调在宿主存活中的必需基因以及表达那些感染所必需的毒力基因。免疫转印结果显示, 体外表达蛋白转印后只能与康复血清发生反应, 表明 SS2 康复血清中含有 TRAG 抗体<sup>[14]</sup>, 提示该基因在 SS2 体内感染时表达, 这与用 IVIAT 技术鉴定微生物体内感染特异性基因的初衷相符<sup>[15]</sup>。此外, 该结果与实时荧光定量 RT-PCR 检测的结果一致: *trag* 在体外培养时呈瞬时表达, 提示该基因在体外培养时是非必需的, 只是一过性表达; 在体内感染时, TRAG 转录水平持续上升, 表明可能与 SS2 体内感染相关<sup>[13]</sup>。检测血清中是否存在 TRAG 抗体, 可鉴别链球菌自然感染康复猪与灭活疫苗免疫猪。

近年来的研究表明, 全球性暴发性感染疾病与病原菌的基因水平转移有密切关系, 其中 TFSS 在许多致病菌的毒力因子的转移、毒力蛋白的分泌过程中起重要作用。如百日咳波氏菌通过 *Pt1* 将百日咳毒素输送到细菌外, 引起细胞中毒。在幽门螺杆菌中发现了多个 TFSS, 介导结合质粒 DNA 在不同菌株间转移, 对该基因突变后结合效率下降  $10^{6[16]}$ 。

基因的水平转移对 SS2 基因的多样性也具有重要作用。TRAG 是 TFSS 的组成单位, 在细菌感染过程中可能参与毒力因子的转移、毒力蛋白的分泌使宿主菌产生相应的酶或毒素, 导致毒力增强。目前, 发现无乳链球菌 H36B 基因组的 TRAG 序列位于转座子 Tn5252 中, 提示 TRAG 可能是作为外源基因, 由转座子携带进入细菌后整合到基因组中的<sup>[17]</sup>。SS2 中国株 98HAH33 和 05ZYH33 基因组测序中发现一 89kb 大小的可能致病岛, TFSS 处于其中<sup>[18]</sup>。

本试验采用的 SS 分离株中, SS2 中 94% (30/32), SS9 中 67% (4/6), SS7 均扩出目的片段, 而欧洲株 ATCC43765 和非毒力株 T15 未扩增出目的片段, SS1、SS1/2 及 C 群猪源链球菌也未见目的片段, 提示该基因可能与 SS2 的毒力相关, 而其致病机制还有待进一步研究。将测序的 5 株 SS 的 TRAG 氨基酸序列与 89/1591、98HAH33 和 05ZYH33 的利用软件

比对, 结果表明, 同源性大于 97%。而在 Sanger 数据库中搜索结果显示, 欧洲株 P1/7 无相关序列, 显示 SS 菌株间存在地理差异性, 其致病机制远比想像的复杂。

致谢 感谢南京农业大学动物医学院预防兽医微生物组张炜博士!

### 参 考 文 献

- [1] 陆承平. 兽医微生物学. 第四版. 北京: 中国农业出版社, 2007, pp87-92.
- [2] Yu H, Jing H, Chen Z, *et al.* Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis*, 2006,12(6): 914-920.
- [3] Charland N, Jacques M, Lacouture S, *et al.* Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotype 1, 2 and 1/2. *Microbiology*, 1997, 143(9): 3607-3614.
- [4] Vecht U, Wisselink HJ, Smith HE, *et al.* Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun*, 1991, 59(5): 3156-3162.
- [5] Jacobs AA, Leon L, Berg AJ, *et al.* Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin sullysin of *Streptococcus suis*. *Infect Immun*, 1994, 62(10): 1742-1748.
- [6] Serhir B, Dubreuil D, Jacques M, *et al.* Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. *J Bacteriol*, 1995, 177(2):3830-3836.
- [7] Wang K, Lu C. Adhesion activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a Chinese *Streptococcus suis* type 2 strain. *BMJ*, 2007, 120(5-6): 207-209.
- [8] 顾宏伟, 陆承平, 猪链球菌 2 型新的感染相关因子自溶素的鉴定与分析. *微生物学报*, 2008, 48(1):68-72
- [9] 张炜, 吴宗福, 陆承平. 猪链球菌 2 型一种新的免疫原性蛋白的鉴定及特性分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(6): 1050-1054.
- [10] Peter J Christie. Type IV secretion :intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular Microbiology*, 2001, 40: 294-305.
- [11] Zhang W, Lu CP. Immunoproteomics of extracellular proteins of Chinese virulent strains of *Streptococcus suis* type 2. *Proteomics*, 2007, 7(24): 4468-4476.
- [12] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [13] 顾宏伟, 陆承平. 猪链球菌 2 型感染相关因子筛选、鉴定及分子特性分析. 南京农业大学博士论文, 2007.
- [14] 郭吕, 唐俐, 郭新瑛, 等. 胆结石患者血清和胆汁幽门螺杆菌免疫印迹检测分析. *临床消化病杂志 (Chinese Journal of Clinical Gastroenterology)*, 2002, 14 (4): 168-170.
- [15] 陈师勇, 莫照兰, 张培军, 等. 细菌毒力基因体内表达检测技术研究进展. *遗传 (Hereditas)*, 2005, 27 (3): 505-511.
- [16] James E. Gunton, Matthew W. Gilmour Subcellular localization and functional domains of the coupling protein, TraG, from IncHI1 plasmid R27. *Microbiology*, 2005, 151: 3549-3561.
- [17] Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial 'pan-genome'. *PNAS*, 2005, 102 (39): 13950-13955.
- [18] Chen C, Tang J, Dong W. A Glimpse of Streptococcal Toxic Shock Syndrome from Comparative Genomics of *S. suis* 2 Chinese Isolates. *PLoS ONE*, 2007, 2(3): e315.

## Identification and detection of *trag*: a new infection-related gene expressed *in vivo* from isolates of *Streptococcus suis*

Haodan Zhu, Hongwei Gu, Chengping Lu\*

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostics and Immunology of the Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract: [Objective]** The *trag* (transfer gene G) was one of the novel infection-related factors identified by *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) from *Streptococcus suis* type 2 expression libraries with swine convalescent

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2006CB50443)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84396517; E-mail: lu cp@njau.edu.cn

Received: 15 April 2008/ Revised: 20 June 2008

sera in our former research. We detected the distribution of *trag* in different *Streptococcus suis* isolates and identify the differential expression of the new infection-related factor between *in vivo* and *in vitro* condition. **[Methods]** According to the sequence of *trag* of North American strain 89/1591, a pair of primers were designed to detect the distribution of *trag* in total 43 SS isolates. Another pair of primers were designed to amplify the ORF of *trag* of 5 SS representative strains (ZY05719, HA9801, 98012, SH040805, SH040917). Partial gene of *trag* was cloned and inserted into expression vector pET28a(+), and induced by IPTG to express recombinant TRAG. The recombinant protein was probed with swine convalescent sera and immune sera respectively. **[Results]** The *trag* was detected in the most of SS2 isolates (30/32), in SS9 isolates (4/6), and 1 isolate of SS7, while it was not found in SS2 European strain ATCC43765, avirulent strain SS2 T15, 1 isolates of SS1, 1 isolates of SS1/2 and 2 isolates of group C streptococcal strains from pigs. Comparisons between the sequences of TRAG of 5 isolates with that of SS isolates, showed a high homology (>97%) with North American strain 89/1589 and China strains 98HAH33,05ZYH33. The immunoreactivity was only presented with convalescent sera. **[Conclusion]** The *trag* was detected from virulent SS isolates but not from avirulent strain, which suggested that this gene may be related to the pathogenicity of SS. The special reactivity was only present with convalescent sera, and it indicated that TRAG might play a role during SS2 invasive course.

**Keywords:** *Streptococcus suis* type 2; PCR detection; transfer protein G (TRAG); identification;

### 2008 年中国科学院微生物所期刊联合编辑部联合增订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号 :ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号 : 2-504; 国外邮发代号 : BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号 : ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号 : 82-13; 国外邮发代号 : BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号 :ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号 : 2-817; 国外邮发代号 : BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号 :ISSN 1672-6472/Q, CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号 : 2-499; 国外邮发代号 : Q723。
订阅	欢迎广大读者与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址 : (100101)北京市朝阳区大屯路中国科学院微生物研究所 B401
	收信人 : 《×××》编辑部; 联系人 : 韩力; 电话 : (010)64807521; E-mail : hanl@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量